



# Mécanismes centraux sous-tendant les altérations cardiorespiratoires induites par un stress chronique

Charly Brouillard

## ► To cite this version:

Charly Brouillard. Mécanismes centraux sous-tendant les altérations cardiorespiratoires induites par un stress chronique. Neurosciences [q-bio.NC]. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2015. Français. NNT : 2015PA066383 . tel-01272811

**HAL Id: tel-01272811**

**<https://theses.hal.science/tel-01272811>**

Submitted on 11 Feb 2016

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**THÈSE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE  
(UPMC - PARIS VI)**



Ecole Doctorale : « Cerveau, Cognition, Comportement »

Spécialité : **NEUROSCIENCES**

Présentée par :  
**Charly BROUILLARD**

Pour l'obtention du grade de :  
**DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE**

**Mécanismes centraux sous-tendant les  
altérations cardiorespiratoires induites par  
un stress chronique**

Date de soutenance publique : 21 septembre 2015

Devant le jury composé de :

**Professeur Philippe FOSSATI**

Président, Examineur

**Professeur Aurélien PICHON**

Rapporteur

**Professeur Claude JULIEN**

Rapporteur

**Professeur Elisabeth LAMBERT**

Examineur

**Docteur Laurence LANFUMEY-MONGREDIEN**

Examineur

**Docteur Caroline SEVOZ-COUCHE**

Directeur de thèse

# Résumé en français

---

Un stress intense et répété peut être à l'origine de troubles émotionnels majeurs. Les pathologies cardiorespiratoires liées aux troubles anxieux et dépressifs constituent un problème sanitaire de grande ampleur. Au terme d'une procédure consistant à soumettre des rats à un protocole de défaite sociale, tous les animaux présentent un profil de type anxieux 5 jours après le stress (D10). Environ la moitié des rats stressés ont montré des atteintes cardiovasculaires et respiratoires persistantes à long terme, à savoir une hyperactivité sympathique, une inhibition du baroréflexe cardio-vagal et une bradypnée, à D10 mais aussi à D30 lorsque le profil anxieux avait disparu. Ces modifications s'accompagnent d'altérations cardiaques électriques (arythmies) et morphologiques (hypertrophie). Deux principales zones cérébrales à l'origine de la persistance des modifications cardiorespiratoires ont été identifiées, le noyau dorsomédian de l'hypothalamus (DMH) et le noyau du tractus solitaire (NTS). Cette population d'animaux présentant des altérations cardiorespiratoires persistantes est aussi caractérisée par un taux de BDNF sanguin faible, marqueur d'une vulnérabilité à la dépression, et par une augmentation de BDNF dans la RVL et le NTS, conséquence possible de l'existence d'un stress oxydant. L'angiotensine II semble également impliquée dans ces atteintes cardiorespiratoires. Ainsi, ce travail a permis de mettre en évidence un circuit central impliqué dans les atteintes cardiorespiratoires liés aux troubles anxiodépressifs afin d'envisager des cibles thérapeutiques plus spécifiques.

Mots clés : Anxiété ; dépression ; système nerveux autonome ; baroréflexe ; bradypnée

# Résumé en anglais

---

## **Central mechanisms underlying cardiorespiratory alterations induced by chronic stress**

Chronic stress can cause major emotional disorders. Cardiorespiratory diseases related to anxiety and depression is a major health problem. After a social defeat paradigm, all animals exhibited an anxiety-like state five days after stress (D10). About half of the stressed rats have shown long term persistent cardiovascular and respiratory modifications, namely a sympathetic hyperactivity, an inhibition of cardio-vagal baroreflex and a bradypnea, at D10 but also D30 when anxiety profile disappeared. They were associated to electric (arrhythmias) and morphologic (hypertrophy) cardiac alterations. Two main brain areas involved in the persistence of cardiorespiratory changes were identified, the dorsomedial nucleus of the hypothalamus (DMH) and the nucleus of the solitary tract (NTS). This population with persistent cardiorespiratory alterations were also characterized by a lower blood level of BDNF, a marker of vulnerability to depression, and by higher BDNF expression in the RVL and NTS. Angiotensin II may also be involved in these modifications. Thus, this study has highlighted a central pathway in cardiorespiratory modifications related to anxiety and depression to consider more specific therapeutic targets.

# Remerciements

---

Je voudrais sincèrement remercier les professeurs Aurélien Pichon et Claude Julien d'avoir accepté d'être rapporteurs de mon travail de thèse et de consacrer une partie de leur temps pendant l'été, à la lecture de mon manuscrit. Je voudrais aussi remercier les autres membres du jury, le Pr Elisabeth Lambert et le Dr Laurence Lanfumey-Mongredien, d'avoir bien voulu examiner mon travail et tout particulièrement, je remercie le Pr Philippe Fossati d'avoir accepté de présider ce jury de thèse qui me fait l'honneur de présider ce jury.

Je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance envers le Dr Caroline Sévoz-Couche pour m'avoir encadré et guidé tout au long de ces 3 années. Je la remercie d'une part de m'avoir accueillie et fait confiance pour réaliser cette thèse, et d'autre part pour ses grandes qualités scientifiques, son expertise, son esprit analytique ainsi que pour le temps accordé à la correction de mon manuscrit et des articles. Ce fut une expérience très enrichissante auprès d'elle autant sur le plan scientifique qu'humainement. Elle a fait preuve de beaucoup de patience et sa rigueur scientifique me guidera pour l'avenir.

J'adresse ma sincère gratitude au Pr Jean-Jacques Bénoliel pour m'avoir accueilli dans son laboratoire lors de ma première moitié de thèse. Ses connaissances scientifiques m'auront été très utiles. Je le remercie aussi pour sa disponibilité et son expertise pour les articles. Je remercie également le Dr Chrystel Becker pour son impressionnante détermination et rigueur scientifique.

Je remercie sincèrement le Pr Thomas Similowski, le Pr Christian Strauss et le Pr Laurence Bodineau qui nous ont accueillis Caroline et moi au cours de ma seconde moitié de thèse permettant d'étendre le sujet de ma thèse sur la respiration. Leurs connaissances techniques et scientifiques dans ce domaine m'auront beaucoup apporté ainsi que leur soutien et leur bonne humeur.

J'accorde également ma sincère gratitude aux personnes avec qui j'ai travaillé et collaboré durant ma thèse à commencer par Françoise Camus dont la gentillesse est inégalable et même envers les rats qu'elle chouchoute. Ce fut un réel plaisir de la côtoyer lors de la première

partie de thèse et je la remercie de m'avoir fait découvrir ces succulents sablés à la cannelle. Je lui souhaite par ailleurs une très bonne retraite, bien méritée !

Merci également au Pr Pascal Carrive, avec qui j'ai travaillé sur les techniques de télémétrie, pour son expertise et son aide dans ce domaine. Il a énormément apporté à ma thèse et je le remercie de m'avoir accueilli dans son laboratoire à Sydney pendant un mois. Nous avons eu des discussions très intéressantes et Pascal est une personne très attachante humainement.

Je tiens à remercier pour leur aide et leur sympathie les membres du 4<sup>ème</sup> étage, qui ont contribué à mes expériences. Plus particulièrement, le futur Docteur Vincent Martin et son encadrante le Docteur Laurence Lanfumey-Mongredien avec qui j'ai réalisé des expériences sur la souris. Merci à tous les membres de cette équipe pour leur sympathie et leurs blagues (spécial *Big up* au duo de « gougouttes » Samy et Vincent). Par ailleurs, je souhaiterais aussi m'excuser auprès d'eux pour mes T-shirts troués !

Je remercie toutes les personnes que j'ai côtoyées lors de ma thèse au bureau et à la paillasse à commencer par l'ensemble des étudiants du 7<sup>ème</sup>, ou devrais-je dire étudiantes, à commencer par les thésardes notamment Fanny qui connaît la même aventure que moi en ce moment donc on s'est bien soutenu mentalement, ainsi que Camille et Anne-Sophie pour leur joie de vivre ! Une grosse pensée aussi pour les stagiaires de Master 2 qui sont passés par là durant ces 3 années dont la joviale Blanca, la bio(logiste) Emilienne, la musicophile Alessandra et surtout la petite dernière Tabinda avec son petite grain de folie (je reste « *soft* » *ahaha*). Leur bonne humeur et leur envie rafraichissante ont amené une bonne ambiance au labo. En tout cas, j'étais bien entouré dans le bureau !! J'ai fini par engrener tout le monde à manger au parc le midi où ça s'est terminé en partie de jambes en l'air (hein Emilienne ?!), de sieste avec mon petit Vincent... De bons moments, et un grand bravo à Alessandra, Fanny et Tabinda qui sont venues me défier plusieurs fois à la PPG !

Spéciale dédicace à mon poto préféré Mathieu pour sa vision positive de la vie, sa joie de vivre, ses discussions et les repas partagés au parc les midis. De bons moments passés avec lui tout simplement et une personne très attachante. Damien a de la chance de travailler avec un gars comme ça, et je remercie aussi Damien pour son aide et sa grande disponibilité auprès des autres.

Je fais également un gros bisou de remerciement à tous ceux que j'ai côtoyés durant ma thèse à commencer par Hanady qui fut d'un soutien indispensable durant l'écriture de ma thèse, me

faisant relativiser grâce à nos pauses mémorables, qui a su embellir ces moments de solitude face à mon PC. Bien évidemment, une pensée particulière à mes colocataires à commencer par mon ancien colocataire de 2<sup>ème</sup> année, Alex qui a terminé sa thèse un an avant moi et dont la gestion et l'organisation dans l'écriture de son manuscrit m'a impressionné après coup, et ma colocataire actuelle, Marta avec son côté artistique décalé qui m'a permis de relativiser et décompresser dans les moments intenses de rédaction. Un grand merci à vous deux !! J'ai une pensée aussi à mes potes vélomans de l'ACBB avec qui j'ai pu partager de bons moments lors des entraînements le soir ou lors des compétitions, sans oublier la saison hivernale dans les pubs! Des instants de décompressions comme ça qui font du bien mais qui était plus rares en fin de thèse, merci à eux !!

Enfin, un grand merci à mes proches pour leurs encouragements. Je remercie particulièrement tous les membres de ma famille pour leur soutien depuis le début de mes études, à commencer par mes parents et mon frère. Malgré l'éloignement géographique et leur méconnaissance du milieu de la recherche, ils m'ont fait confiance et ça, ça n'a pas de prix.

*« Adopting the right attitude can convert a negative stress into a positive one. »*

Hans Selye

*« Bien faire et se tenir en joie »*

Baruch Spinoza

*«The weak can never forgive, forgiveness is an attribute of the strong»*

Mahatma Gandhi

# SOMMAIRE

---

<b>Liste des abréviations</b>	<b>1</b>
<b>Liste des illustrations</b>	<b>3</b>
<b>INTRODUCTION GENERALE</b>	<b>5</b>
<b>RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES</b>	<b>7</b>
<b>CHAPITRE I : LE SYSTEME CARDIORESPIRATOIRE</b>	<b>8</b>
<b>I) Physiologie du système cardiovasculaire</b>	<b>8</b>
<b>A) La régulation de la pression artérielle</b>	<b>8</b>
1) Facteurs à court terme	8
(i) Le débit cardiaque	8
(ii) La résistance périphérique totale	9
2) Facteurs à long terme	10
<b>B) Le système nerveux autonome</b>	<b>12</b>
1) Généralités	12
2) Le système nerveux autonome sympathique	13
(i) Commande périphérique	13
(ii) Influence centrale	14
3) Le système nerveux autonome parasympathique	18
<b>C) Le baroréflexe</b>	<b>19</b>
1) Rôle fonctionnel du baroréflexe	19
2) Voies neuronales du baroréflexe	20
(i) Convergence des afférences barosensibles dans le noyau du tractus solitaire	20



(ii) Efférences du baroréflexe	21
(iii) Le noyau du tractus solitaire	23
3) Méthode d'analyse du baroréflexe	34
(i) Analyse du baroréflexe spontanée	34
(ii) Analyse du baroréflexe Pharmacologique	35
<b>D) Variabilité de la fréquence cardiaque</b>	<b>36</b>
1) Généralités	36
2) Méthodes d'analyse de la VFC	38
(i) Domaine fréquentiel	38
(ii) Domaine Temporel	40
(iii) Analyse géométrique	41
(iv) Analyse non-linaire : Poincaré	41
3) Etude de la VFC comme index de mortalité cardiovasculaire	42
 <b>II) Physiologie du système respiratoire</b>	 <b>43</b>
A) Notions générales	43
B) Commande centrale respiratoire	44
C) Modulations centrales et périphériques	46
 <b>III) Interaction des systèmes cardiovasculaires et respiratoires : étude par la VFC</b>	 <b>48</b>
 <b>CHAPITRE II : LE STRESS</b>	 <b>50</b>
 <b>I) Notions générales</b>	 <b>50</b>
 <b>II) Bases physiologiques du stress</b>	 <b>52</b>
A) Le système limbique	52
B) L'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien ou axe HHS	52
1) L'hypothalamus	52
2) L'hypophyse	53
3) Les glandes surrénales	53
4) Les récepteurs aux corticostéroïdes	54

<b>III) Pathologies liées au stress : troubles anxiodépressifs</b>	<b>56</b>
<b>A) Généralités</b>	<b>56</b>
<b>B) Troubles dépressifs</b>	<b>56</b>
1) Généralités	56
2) Pharmacothérapie	58
<b>C) Troubles anxieux</b>	<b>60</b>
1) Généralités	60
2) Pharmacothérapie	61
3) Modèles de stress induisant des états anxieux (temporaires) chez l'homme	61
 <b>IV) Modèles animaux de stress</b>	 <b>62</b>
<b>A) Modèles non basés sur l'interactivité</b>	<b>62</b>
1) Modèles de stimuli douloureux	62
2) Modèles de stimuli non-douloureux	63
3) Modèles basés sur la nouveauté	64
4) Modèles de contention	64
5) Modèle du stress chronique modéré (SCM) ou « Chronic Mild Stress » (CMS)	64
6) Modèles génétiques	65
7) Modèles de stress prénataux	66
<b>B) Modèles basés sur l'interactivité</b>	<b>66</b>
1) Modèles de stress néonataux	66
2) Défaite sociale	66
3) Modèles de déprivation sociale et sensorielle	67
<b>C) Tests comportementaux et physiologiques</b>	<b>68</b>
1) Diagnostic des symptômes de type dépressifs	68
(i) Test de la nage forcée et test de suspension par la queue	68
(ii) Test de toilettage provoqué (« splash test »)	69
(iii) Test d'alimentation supprimée par la nouveauté (« novelty suppressed feeding »)	70
(iv) Test d'interaction sociale	70
2) Diagnostic des symptômes de type anxieux	71
(i) Test du labyrinthe en croix surélevé ou « Elevated Plus Maze (EPM) »	71
(ii) Open Field	71
(iii) Light Dark Test	72
(iv) Test d'enfouissement défensif	72
 <b>V) Comorbidité des pathologies cardiorespiratoires et anxiodépressives</b>	 <b>72</b>

<b>A) Notions Générales</b>	<b>72</b>
<b>B) Modifications cardiovasculaires induites par le stress</b>	<b>73</b>
1) Altération du SNA sympathique	73
2) Altération du SNA parasympathique	74
3) Effets des traitements anxiodépresseurs	75
<b>C) Modifications respiratoires induites par le stress</b>	<b>75</b>
<b>D) Circuits neuronaux impliqués dans les réactions cardiorespiratoires induites par la réaction de défense</b>	<b>77</b>
 <b>MATERIEL ET METHODES</b>	 <b>80</b>
 <b>I) Procédures générales du stress et d'évaluation du stress</b>	 <b>81</b>
A) Défaite sociale chez le rat	81
B) Défaite sociale chez la souris	82
C) Modifications de paramètres comportementaux et biologiques par la défaite sociale	82
1) Evaluation chez le rat Sprague-Dawley	82
2) Evaluation chez la souris C57BL/6J :	83
 <b>II) Enregistrements des paramètres cardiorespiratoires</b>	 <b>84</b>
A) Techniques chirurgicales pour les enregistrements des paramètres cardiovasculaires sur rats anesthésiés : canulations et électrocardiogramme	84
B) Techniques chirurgicales pour les enregistrements des paramètres cardiovasculaires sur rats éveillés: enregistrements télémetriques	85
C) Techniques chirurgicales pour l'enregistrement de la respiration chez le rat anesthésié et éveillé	86
 <b>III) Evaluation des paramètres cardiorespiratoires</b>	 <b>87</b>
A) Mesure de la VFC	87
B) Mesure du baroréflexe	88

<b>IV) Traitement pharmacologique aigu et chronique</b>	<b>89</b>
A) Traitements et microinjections aiguës et locales dans le DMH et le NTS sous anesthésie	89
B) Traitement pharmacologique chronique	89
<b>V) Dosage</b>	<b>90</b>
A) Dosage protéique du BDNF : méthode ELISA	90
B) qRT-PCR	91
<b>VI) Histologie</b>	<b>92</b>
<b>VII) Analyses statistiques</b>	<b>93</b>
<b>RESULTATS</b>	<b>94</b>
<b>Etude I :</b>	<b>95</b>
<b>Implication du DMH et des récepteurs 5-HT<sub>3</sub> du NTS dans les modifications cardiovasculaires induites par un stress chronique</b>	<b>95</b>
<b>INTRODUCTION</b>	<b>96</b>
<b>Résultats complémentaires</b>	<b>100</b>
<b>CONCLUSION de l'étude I</b>	<b>113</b>
<b>Etude II :</b>	<b>118</b>
<b>Implication du DMH et des récepteurs 5-HT<sub>3</sub> du NTS dans les modifications respiratoires induites par un stress chronique</b>	<b>118</b>
<b>INTRODUCTION</b>	<b>119</b>

<b>Résultats complémentaires</b>	<b>122</b>
<b>CONCLUSION de l'étude II</b>	<b>125</b>
<b>DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES</b>	<b>127</b>
<b>I) Discussion</b>	<b>128</b>
A) Introduction	128
B) Validation des méthodes	131
C) Modélisation du lien entre l'anxiété et les troubles cardiorespiratoires	133
D) Identification du rôle du DMH et des récepteurs 5-HT <sub>3</sub> du NTS	137
E) Rôle de l'angiotensine II	139
<b>II) Perspectives</b>	<b>144</b>
A) Angiotensine et BDNF	144
B) Réponses respiratoires du chémoréflexe périphérique et du baroréflexe après un stress social	145
C) L'hypothèse du rôle central de l'orexine	146
1) Système orexinergique	146
2) Rôle dans le contrôle cardiovasculaire	146
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b>	<b>148</b>

# Liste des abréviations

---

5-HT : 5-hydroxytryptamine ou Sérotonine  
 AAE : Acide aminé exciteur  
 ACTH : Hormone corticotrope (Adreno Cortico Tropic Hormone)  
 ADH : Hormone antidiurétique  
 ANF : Facteur natriurétique atrial  
 ARNm : Acide ribonucléique messenger  
 ASR : Arythmie sinusale respiratoire  
 AT<sub>1</sub> Récepteur de type 1 à l'angiotensine  
 AT<sub>2</sub> : Récepteur de type 2 à l'angiotensine  
 BDNF : Brain-derived-neurotrophic-factor  
 BPCO : Broncho Pneumopathie Obstructive Chronique  
 bpm : Battements par minute  
 BRR : Réponse cardiaque du baroréflexe  
 BRS : Barosensibilité  
 CCR : commande centrale respiratoire  
 CDZ : Chlordiazépoxide  
 CILM : Corne intermédiolatérale de la moelle épinière  
 CnF : Noyau cunéiforme  
 CRF : Corticolibérine ou CorticoReleasing Factor  
 CVL : Région caudoventrolatérale du bulbe  
 DC : Débit cardiaque  
 dlPAG : Substance grise périaqueducule dorsolatérale  
 DMH : Noyau dorsomédian de l'hypothalamus  
 DMX : Noyau dorsal du vague  
 DS : Défaite sociale  
 DSM : Diagnostic and statistical manual of mental disease  
 ECA : Enzyme de conversion de l'angiotensine  
 EEG : Electroencéphalographie  
 EPM : Elevated Plus Maze  
 FC : Fréquence cardiaque  
 FSL : Flinder-sensitive line  
 GABA : Acide gamma-amino-butyrique  
 GR : glucocorticoïdes  
 GRD : Groupe respiratoire dorsal  
 GRV : Groupe respiratoire ventral  
 HF : High frequency  
 IDM: Infarctus du myocarde  
 IMAO : Inhibiteurs de ces enzymes  
 IRN : Inhibiteurs sélectifs de recapture de la noradrénaline

IRSN : Inhibiteurs sélectifs de recapture de la 5-HT et de la noradrénaline

ISRS : Inhibiteurs sélectifs de recapture de la 5-HT

KO : Knock Out

LCR : Liquide céphalo-rachidien

LF : Low frequency

LPGi : Noyau réticulaire paragigantocellulaire

MAO : Monoamine oxydase

MR : Minéralocorticoïdes

NA : Noyau ambigu

NMDA : N-methyl-D-aspartate

Noyau dorsal du nerf vague

NTS : Noyau du tractus solitaire

PA : Pression artérielle

PAG : Substance grise périaqueducule

PCR : Polymerase chain reaction

PE : Phényléphrine

PeF : région périfornicale de l'hypothalamus

PPSE : Potentiel post-synaptique exciteur

Pré-BötC : Complexe de Pré-Bötzinger

PRG : Groupe respiratoire pontique

PTSD : Syndrome de stress post-traumatique

PVN : Noyau paraventriculaire

RMg : Noyau raphé magnus

rMSSD : Root Mean Square of Successive Differences ou moyenne quadratique des intervalles R-R successifs

RPT : Résistance périphérique totale suivant la relation

RTN/pFRG : noyau rétrotrapezoïde et groupe respiratoire parafacial

RVL : Région rostroventrolatérale du bulbe

RVM : Région rostroventromédiane du bulbe

s.c. : Sous-cutané

SCM: Stress chronique modéré

SDNN : deviation of normal R-R intervals ou moyenne des déviations standards de l'intervalle R-R

SGA : Syndrome général d'adaptation

SNA : Système nerveux autonome

SNC : Système nerveux central

SRAA : Système rénine-angiotensine-aldostérone

SOD : Superoxyde dysmutase

TAG : Trouble d'anxiété généralisée

TOC : Troubles obsessionnels compulsifs

VFC : Variabilité de la fréquence cardiaque

VLF : Very low frequency

WKY : Wistar-Kyoto

# Liste des illustrations

---

<b><u>Tableaux</u></b>	<b>Pages</b>
Tableau 1 : les principales fonctions du système nerveux autonome sur les organes de l'organisme	13
Tableau 2 : Liste des Primer utilisés pour la qRT-PCR	91

<b><u>Figures</u></b>	<b>Pages</b>
Figure 1 : Facteurs déterminants de la pression artérielle et leur modulation par le système nerveux autonome	9
Figure 2 : Contrôle de la pression artérielle par le système nerveux autonome	15
Figure 3: Schéma récapitulatif des voies bulbaires du baroréflexe	22
Figure 4: Localisation du noyau du tractus solitaire	24
Figure 5 : Noyaux du raphé	29
Figure 6 : Les différentes périodes et ondes PQRST d'un électrocardiogramme (ECG)	37
Figure 7: Pattern de différentes variabilités de fréquence cardiaque (VFC)	37
Figure 8: Spectre de densité obtenu à partir de l'intervalle RR d'un ECG	39
Figure 9: Analyse de la variabilité de la fréquence cardiaque par la méthode du Poincaré	42
Figure 10: Anatomie des structures bulbaires impliquées dans le contrôle de la respiration (Adapté de Seta et al. 2002)	45
Figure 11 : réflexe de Bainbridge	48
Figure 12 : Variabilité de la fréquence cardiaque au repos et lors de la cohérence cardiaque	49
Figure 13 : Les différentes phases du syndrome général d'adaptation (SGA)	51
Figure 14: Axe du stress	53
Figure 15 : Défaite sociale chez le rat	81
Figure 16 : Test d'interaction sociale	84
Figure 17 : photo de la procédure chirurgicale pour placer le cathéter de l'implant télémétrique dans l'aorte abdominale	85
Figure 18 : Analyse du baroréflexe spontanée par la méthode des séquences	88
Figure 19 : Représentation d'un cycle de PCR avec les différentes étapes	92
Figure 20: Protocole de l'Article 1. Analyse à court terme (D10) des paramètres cardiovasculaires sous anesthésie	97
Figure 21 : Protocole de l'Article 2. Analyse à long terme (D30) des paramètres cardiovasculaires sous anesthésie et en télémétrie	97



Figure 22 : Différenciation des deux sous-populations des rats stressés sur la base de la VFC (A) obtenues sous anesthésie 5 jours après la fin de la défaite sociale (D10), et montrant une différence au niveau de la fréquence cardiaque (B) et de la pression artérielle (C)	100
Figure 23 : Evaluation du phénotype de type anxieux à D10	101
Figure 24 : Inhibition à long terme (D30) du baroréflexe (A) et effet des microinjections de muscimol dans le DMH (B) ou de granisetron dans le NTS (C)	102
Figure 25 : Effet des microinjections de granisetron dans le NTS sur la VFC	103
Figure 26 : coupes histologiques montrant la localisation des microinjections réalisées	104
Figure 27 : Taux de BDNF protéique normalisé par rapport au poids du tissu prélevé dans le NTS à différents stades post-stress (D10 et D30)	105
Figure 28: Protocole de défaite sociale chez la souris	106
Figure 29 : Catégorisation des souris sensibles $D_S$ et résistantes $D_R$ au stress à partir du test d'interaction sociale et analyse des paramètres cardiovasculaires chez ces deux populations	107
Figure 30: Dosage des ARNm par qRT-PCR dans le NTS. Evaluation du taux d'expression des ARNm du BDNF total (BDNF 9), du BDNF 6 et des récepteurs 5-HT <sub>3A</sub>	108
Figure 31: Protocole d'analyse des paramètres cardiovasculaires en télémétrie et sous anesthésie avec le traitement au losartan	109
Figure 32: Effet du traitement au losartan sur le ratio LF/HF, la pression artérielle moyenne et le baroréflexe pharmacologique (BRR) mesuré sous anesthésie à D19	109
Figure 33: Effet du traitement au losartan sur le ratio LF/HF mesuré en télémétrie	110
Figure 34: Effet du traitement au losartan sur la pression artérielle moyenne mesurée en télémétrie	111
Figure 35: Augmentation de la pression artérielle par stimulation chimique (bicuculline) du DMH après injection soit d'une solution physiologique soit de losartan dans la RVL	112
Figure 36: Protocole d'analyse du pic ASR en télémétrie et sous anesthésie avec le traitement au losartan	122
Figure 37: Effet du losartan sur la bradypnée. Résultats préliminaires des données télémétriques (A) et sous anesthésie (B)	123
Figure 38: Catégorisation des souris sensibles $D_S$ et résistantes $D_R$ au stress à partir du test d'interaction sociale et analyse du pic ASR chez ces deux populations	124
Figure 39: Proportion à D30 des sous-populations $D_L$ et $D_H$ au sein des groupes $D_A$ et $D_B$	135
Figure 40: Modification du pic ASR au sein des sous-groupes $D_A/D_B$	136
Figure 41: Rôle du DMH et des récepteurs 5-HT <sub>3</sub> dans l'inhibition de la bradycardie du baroréflexe en condition de stress aigu	138
Figure 42: Schéma hypothétique des mécanismes impliqués à la fois dans l'inhibition du baroréflexe et dans la bradypnée induite par l'activation du DMH	144

## **INTRODUCTION GENERALE**

Le stress est à la fois un état psychologique individuel, qui est à placer avec la perception que peut avoir l'individu de son environnement et avec l'expérience émotionnelle qu'il vit en conséquence, et à la fois un état physiologique c'est-à-dire la réaction de l'organisme pour se défendre contre l'agression. Si le stress est le plus souvent dû à une cause externe, il provoque sur l'organisme des réactions internes : c'est la « réponse au stress » ou « réaction de défense ». Elle se manifeste par une élévation de la pression artérielle, une accélération de la fréquence cardiaque et de la fréquence respiratoire. Afin d'augmenter la capacité à se confronter à une provocation stressante, l'organisme va ainsi modifier la fonction physiologique de tous les organes qui concernent sa défense en mobilisant au mieux l'énergie pour garantir la capacité maximum à réagir face au stress. Le stress est donc avant tout une réaction positive qui permet d'agir et de réagir face aux aléas du milieu extérieur.

Cependant, il devient négatif lorsque l'énergie qui a été mise en œuvre ne trouve pas à s'exprimer ou qu'elle ne résout pas la situation. Un stress peut par exemple devenir pathologique pour un individu dans le cadre de stimuli négatifs mineurs mais quotidiens et répétés ou épisodiques mais plus éprouvants. Ces circonstances peuvent être physiques (douleur, effort) ou psychologiques (émotion, colère,). Cela peut entraîner des désordres mentaux tels que le syndrome de stress post-traumatiques et des troubles psychiatriques dont notamment l'anxiété ou la dépression. D'un point de vue physiologique, le métabolisme basal est déséquilibré amenant à des pathologies majeures comme celles affectant le système cardiorespiratoire. Ces pathologies ont une forte prévalence au sein de la société actuelle et sont souvent concomitantes. Les patients atteints de troubles anxieux et dépressifs présentent un déséquilibre du système nerveux autonome cardiaque avec une hyperactivité sympathique et un tonus parasympathique inhibé. Ce déséquilibre représente un risque accru de développer des pathologies cardiovasculaires telles qu'une insuffisance cardiaque, des arythmies ou un infarctus du myocarde. Egalement, les patients anxieux ou dépressifs présentent des modifications au niveau respiratoire. L'anxiété sociale ou les phobies sont souvent associés à une hyperventilation alors que la dépression semble liée à une réduction de l'activité respiratoire (bradypnée). Ceci est à mettre en lien avec une mauvaise adaptation physiologique lors des changements en composition des gaz dans l'air inspiré, pouvant être délétères pour l'organisme. Ainsi, il existe un lien clair entre les pathologies cardiorespiratoires et les troubles émotionnels. Dans un premier temps seront exposées dans ce mémoire les notions bibliographiques sur ce lien et les mécanismes centraux impliqués.

Ensuite, les résultats obtenus afin d'approfondir ces mécanismes seront présentés avant d'être discutés en relation avec les connaissances actuelles.

## **RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES**

# **CHAPITRE I : LE SYSTEME** **CARDIORESPIRATOIRE**

## **I) Physiologie du système cardiovasculaire**

### **A) La régulation de la pression artérielle**

La pression artérielle (PA) est l'un des paramètres hémodynamiques le plus stable. La PA est étroitement régulée par différents mécanismes qui sont eux-mêmes modulés en fonction des conditions physiologiques. Ces mécanismes de régulation se différencient par leur cinétique d'action : **un mécanisme à court terme mettant en jeu le système nerveux autonome** par l'intermédiaire des réflexes cardiovasculaires et **un mécanisme à moyen et à long terme mettant en jeu le système endocrinien**.

#### **1) Facteurs à court terme**

Par définition, la PA dépend du débit cardiaque [DC] et de la résistance périphérique totale [RPT] suivant la relation :  $PA = DC \times RPT$ .

##### **(i) Le débit cardiaque**

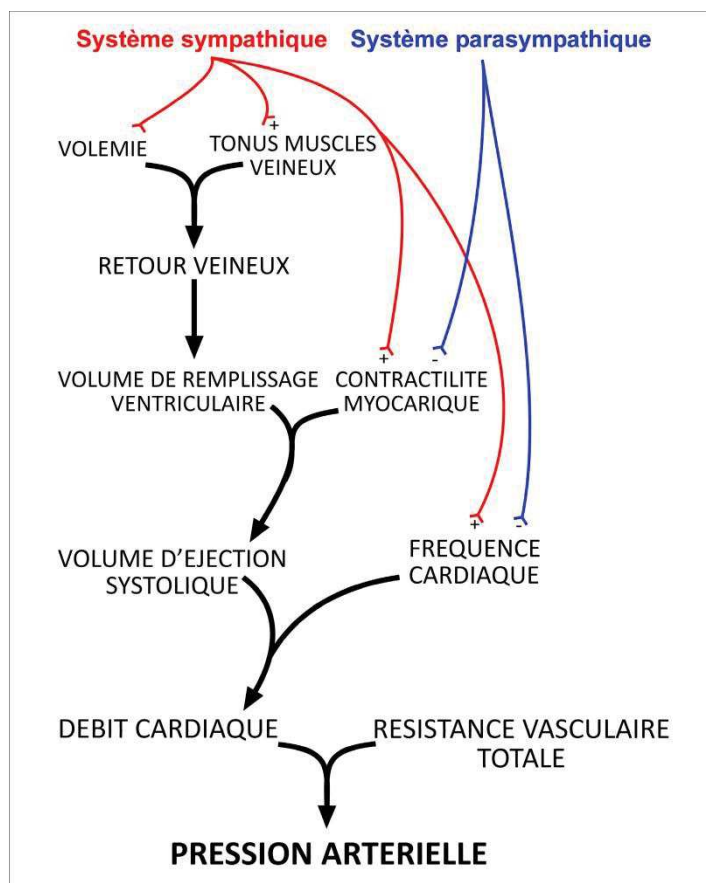
Le **débit cardiaque** (DC) est la quantité de sang éjecté par le ventricule gauche par unité de temps. Il **dépend de la fréquence cardiaque (FC)**, c'est-à-dire du nombre de battement par minute, **et du volume d'éjection systolique** (quantité de sang expulsé par la contraction du ventricule gauche à chaque systole [VES]) (Figure 1).

Soit la relation :  $DC \text{ (ml/min)} = FC \text{ (bpm)} \times VES \text{ (ml/battement)}$ .

**La FC dépend de deux facteurs: l'un intrinsèque, l'autre extrinsèque.** Le facteur intrinsèque correspond à la fréquence de contractions des cellules automatiques du nœud sinusal ; il permet au cœur d'avoir une activité spontanée rythmique. Celle-ci est modulée par le facteur extrinsèque, c'est-à-dire par le niveau d'activité des deux composantes du système nerveux autonome (les composantes sympathique et parasympathique). La stimulation sympathique augmente la FC (effet chronotrope positif), alors que la stimulation parasympathique la diminue (effet chronotrope négatif). Les mécanismes neurochimiques qui sous-tendent ces deux composantes dans la régulation de la PA seront abordés dans un prochain paragraphe sur le système nerveux autonome «Chapitre I, I)B) ».

L'autre facteur qui détermine le débit cardiaque est donc **le volume d'éjection systolique**, directement lié lui-même à la contractilité myocardique. Le volume d'éjection systolique

dépend aussi d'influences sympathique (possède un effet inotrope positif, c'est-à-dire qui induit une augmentation de la contractilité cardiaque) et parasympathique (effet inotrope négatif).



**Figure 1 : Facteurs déterminants de la pression artérielle et leur modulation par le système nerveux autonome**

### **(ii) La résistance périphérique totale**

Cet élément, qui joue un rôle déterminant dans la régulation de la PA, correspond à la résistance que les parois vasculaires opposent à l'écoulement du sang. Le compartiment vasculaire total peut être schématiquement divisé en trois sous-compartiments ou réseaux : le réseau artériel, le réseau artériolaire et le réseau veineux, chacun étant caractérisé par une résistance locale. La résistance périphérique totale est la résultante de l'ensemble de ces résistances (Figure 1).

**Le réseau artériel** (depuis l'aorte jusqu'aux artérioles) est très ramifié. La PA moyenne est maintenue dans des limites très étroites. Le débit et la pression y sont pulsatifs (conséquence directe du fonctionnement cyclique du cœur) et la résistance à l'écoulement est faible. Le

volume de sang contenu dans le réseau artériel est faible comparé au volume contenu dans le réseau veineux.

**Le réseau artériolaire** (ou « réseau résistif »). Les artéioles forment un réseau où la résistance à l'écoulement est élevée et ajustable. Ce réseau est l'effecteur le plus efficace dans la régulation de la PA. Les sphincters artériolaires réduisent la pression à l'entrée des capillaires et y contrôlent en permanence le débit sanguin.

**Le réseau veineux** (ou « réseau capacitif »). La pression veineuse y est faible ainsi que la résistance à l'écoulement. Les veines contiennent la plus grande partie du volume sanguin et la grande extensibilité de leurs parois permet de conserver un bas domaine de pression malgré une importante variation du volume sanguin.

## 2) Facteurs à long terme

L'organisme dispose de plusieurs systèmes d'adaptation et/ou de surveillance qui participent à la régulation à long terme de la PA. Certains de ces processus sont « passifs » (système de tension-relaxation des veines, transferts volumiques transcapillaires...) et tendent à limiter les conséquences hémodynamiques de modifications rapides de la volémie. D'autres sont « actifs » et mettent en jeu des interactions neuro-hormonales complexes. Leur influence s'exerce, avant tout, sur le contrôle de la volémie.

La régulation de la volémie est un mécanisme au long terme et fait intervenir les éléments suivants.

Le système rénal de régulation de la volémie. Une élévation de la PA entraîne une augmentation de l'excrétion urinaire, induisant une diminution du retour veineux central, ce qui réduit le débit cardiaque et la PA. A l'inverse une chute de la PA réduit la diurèse.

L'hormone antidiurétique (ADH ou vasopressine). Cette hormone contrôle essentiellement la réabsorption de l'eau au niveau du rein. La sécrétion d'ADH dépend essentiellement de l'osmolarité plasmatique, mais aussi de la volémie, et de la sécrétion du facteur natriurétique atrial ou d'angiotensine II.

### Système Rénine-Angiotensine-Aldostérone.

Dans le système rénine-angiotensine-aldostérone (SRAA), l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA) joue un rôle clé en catalysant la conversion de l'angiotensine I en angiotensine II, le produit le plus actif biologiquement du SRAA (Kobori et al. 2007).

L'angiotensine II est une hormone interférant avec l'activité de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien (HHS) et avec le système nerveux sympathique en réponse au stress (Ising and Holsboer 2006). L'innervation sympathique de l'appareil juxtaglomérulaire du rein permet de libérer la rénine, enzyme transformant l'angiotensinogène en angiotensine I, qui sera ensuite principalement transformée en angiotensine II par une carboxypeptidase, l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA). Cette enzyme est essentiellement sécrétée au niveau pulmonaire. L'angiotensine II possède deux types de récepteurs AT<sub>1</sub> et AT<sub>2</sub>. Ils ont des rôles antagonistes mais le récepteur AT<sub>2</sub> est plus rare et a des effets vasodilatateurs (Höhle et al. 1995). L'angiotensine II a donc principalement un rôle vasopresseur, via les récepteurs AT<sub>1</sub>. Cet effet a été montré pharmacologiquement soit par blocage de l'enzyme de conversion (ECA) soit par blocage des récepteurs AT<sub>1</sub>. Au vu de la distribution des récepteurs, l'angiotensine II circulant dans le sang va agir à deux niveaux sur la PA.

- Au niveau périphérique, les récepteurs AT<sub>1</sub> sont présents au niveau du myocarde et des vaisseaux sanguins et à un rôle vasoconstricteur (Allen et al. 2000). L'angiotensine stimule aussi la synthèse d'aldostérone par les glandes surrénales, ce qui provoque une rétention de sodium (Na) et des taux excessifs de Na intracellulaire augmentent la réactivité du muscle vasculaire lisse à la stimulation sympathique.
- Au niveau central, l'angiotensine II ne traverse pas la barrière hématoencéphalique mais il existe au sein du cerveau un système rénine-angiotensine intrinsèque (Bader and Ganten 2002; McKinley et al. 2003). L'angiotensinogène, précurseur de l'angiotensine II, est en grande partie exprimé au niveau du bulbe et de l'hypothalamus et sa synthèse a lieu principalement dans les astrocytes (Lynch et al. 1987; Stornetta et al. 1988; Schinke et al. 1999). Son taux de production dépend de divers facteurs tels que le niveau de glucocorticoïde (Deschepper and Flaxman 1990), les glucocorticoïdes activant la synthèse d'angiotensinogène.

La distribution centrale des récepteurs AT<sub>1</sub> coïncide avec les régions impliquées dans le contrôle de l'homéostasie cardiovasculaire, et notamment dans le bulbe (Allen et al. 2000; Lenkei et al. 1997). Ceci sera développé dans le Chapitre I, paragraphe I)A)1)(ii) ii) ainsi que dans le Chapitre I, paragraphe I)C)1)(i)(d).

Le facteur natriurétique atrial (ANF) est une hormone cardiaque sécrétée en réponse à une distension des oreillettes et possède des propriétés diurétique, natriurétique, et vasodilatatrice. Cette hormone joue un rôle majeur dans la régulation à long terme de la PA et de la volémie.



Comme nous l'avons brièvement évoqué dans l'introduction, le système nerveux autonome participe de façon prépondérante à la régulation à court terme de la FC et de la résistance périphérique, et donc par conséquent de la PA.

## **B) Le système nerveux autonome**

### **1) Généralités**

Le système nerveux autonome (SNA, aussi appelé système nerveux (neuro-) végétatif ou système nerveux viscéral) est responsable des fonctions automatiques, non soumises au contrôle volontaire. C'est Langley qui, dès 1903, introduit la notion de système nerveux autonome pour décrire la composante du système nerveux en charge de cette fonction, en opposition à des neurones contrôlant volontairement ou consciemment des fonctions telles que le mouvement d'un membre (Langley 1903). Le SNA régule les fonctions organiques internes, les adapte aux besoins du moment et contrôle les fonctions dites végétatives de l'organisme. Il contrôle notamment les muscles lisses (digestion, vascularisation...), les muscles cardiaques, la majorité des glandes exocrines (digestion, sudation...) et certaines glandes endocrines. Le SNA assure l'homéostasie et l'équilibre du milieu intérieur. Il permet par des réactions viscérales adaptatives d'être le plus opérant lors de l'agression en orientant le système nerveux cérébro-spinal vers une performance optimale.

Le SNA se divise en deux systèmes : la composante sympathique et la composante parasympathique. La plupart des organes sont innervés par les deux systèmes, sympathique et parasympathique, et leurs réponses peuvent être opposées (par exemple ils sont antagonistes dans le cœur) ou identiques (comme dans les glandes salivaires) (Tableau 1). Le SNA module, régule et harmonise la vie végétative des différents organes, contribuant ainsi au maintien de l'homéostasie. La totalité des organes reçoit une innervation végétative.

**Tableau 1 : les principales fonctions du système nerveux autonome sur les organes de l'organisme**

Organe cible	Effet de la stimulation sympathique	Effet de la stimulation parasympathique
<b>Cœur</b>	Augmentation de la fréquence et de la force de contraction	Diminution de la fréquence, diminution de la force de contraction des oreillettes uniquement
<b>Vaisseaux sanguins</b>	Constriction	Dilatation des vaisseaux pénien et clitoridiens
<b>Poumons</b>	Dilatation des bronches	Constriction des bronches, sécrétion de mucus
<b>Tube digestif</b>	Diminution de la motricité, contraction des sphincters, inhibition des sécrétions digestives	Augmentation de la motricité, relaxation des sphincters, stimulation des sécrétions digestives
<b>Vessie</b>	Relâchement	Contraction (évacuation)
<b>Œil</b>	Dilatation de la pupille, accommodation pour la vision à distance	Contraction de la pupille, accommodation pour la vision de près
<b>Foie</b>	Glycogénolyse	Pas d'effet
<b>Adipocytes</b>	Lipolyse	Pas d'effet
<b>Pancréas exocrine</b>	Inhibition de la sécrétion exocrine	Stimulation de la sécrétion exocrine
<b>Glandes sudoripares</b>	Sécrétion de la plupart des glandes	Sécrétion de quelques glandes
<b>Glandes salivaires</b>	Sécrétion d'un faible volume de salive, riche en mucus	Sécrétion d'un grand volume de salive, riche en enzyme
<b>Médullosurrénale</b>	Sécrétion d'adrénaline et de noradrénaline	Pas d'effet
<b>Pancréas endocrine</b>	Inhibition de la sécrétion d'insuline, stimulation de la sécrétion de glucagon	Stimulation de la sécrétion d'insuline et de glucagon
<b>Activité cérébrale</b>	Augmentation de la vigilance	Pas d'effet

## 2) Le système nerveux autonome sympathique

### (i) Commande périphérique

Les neurones préganglionnaires sympathiques sont localisés dans la corne intermédiolatérale de la moelle épinière (CILM), et sont responsables du degré de constriction des vaisseaux. Ces neurones envoient des projections cholinergiques (courtes) aux ganglions sympathiques localisés de chaque côté de la moelle et à la glande médullosurrénale. Les ganglions sympathiques envoient à leur tour des projections postganglionnaires noradrénergiques (longues) sur leurs organes cibles. La noradrénaline libérée par les projections sympathiques a :

- au niveau du cœur, des effets chronotrope et inotrope positifs, via l'activation de récepteurs  $\beta_1$  et  $\beta_2$  adrénergiques (Figure 2),
- au niveau des vaisseaux, un effet vasoconstricteur par stimulation de récepteurs  $\alpha_1$  adrénergiques (Figure 2).

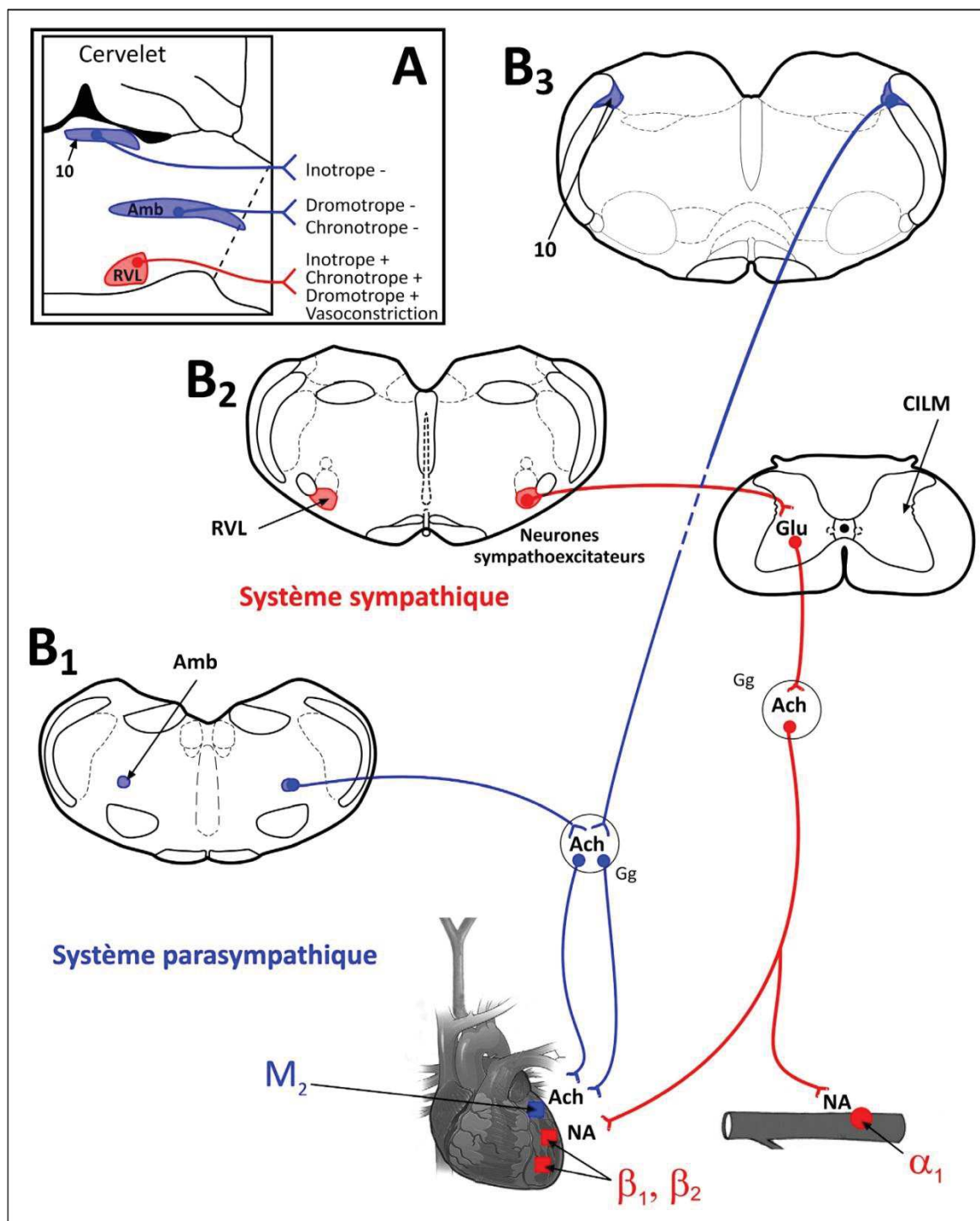
La fréquence de décharge des cellules pré- et postganglionnaires sympathiques détermine le tonus sympathique, donc la libération de noradrénaline au niveau des organes cibles, et *in fine*, la valeur de la PA.

### **(ii) Influence centrale**

#### Rôle clé de la région rostroventrolatérale du bulbe (RVL)

Les cellules préganglionnaires sympathiques de la CILM ne déchargent pas en absence d'influx nerveux. Elles sont dépourvues d'activité intrinsèque de type *pacemaker* (Guyenet 1990) : leur décharge tonique est dépendante d'impulsions excitatrices. Ces impulsions proviennent en grande majorité de la région rostroventrolatérale du bulbe (RVL), située caudalement par rapport au noyau facial (voir Figure 2 B2), et cette région est considérée comme un véritable centre presseur (Guertzenstein & Silver 1974; Spyer 1981; Willette et al. 1984; Sun & Guyenet 1986; Sun et al. 1988). Plusieurs études anatomiques montrent qu'il existe effectivement des projections de la RVL vers la CILM (Loewy et al. 1981; Ross et al. 1985; Tucker et al. 1987; Milner et al. 1988).

Des expériences de microstimulations ont montré qu'en fonction du site de la RVL stimulé, différents *patterns* d'activités des nerfs sympathiques pouvaient être évoqués. Ces expériences ont amené à émettre l'hypothèse d'une organisation « organotopique » de ces neurones sympathoexcitateurs. Des sous-groupes de neurones individualisés seraient préférentiellement dédiés au contrôle de certains organes (McAllen & Dampney 1990; McAllen et al. 1995; Campos & McAllen 1997). Toutefois les études anatomiques utilisant des virus neurotropes comme traceur transneuronal et montrant un haut degré de « collatéralisation » de ces neurones, remettent en question une telle hypothèse (Jansen et al. 1995; Sved et al. 2001; Kerman et al. 2003; Stornetta et al. 2004).



**Figure 2 : Contrôle de la pression artérielle par le système nerveux autonome**  
**Influences sympathiques et parasympathiques sur le cœur et les vaisseaux**  
 B<sub>1</sub> : -13,00 mm ; B<sub>2</sub> : -12,12 mm ; B<sub>3</sub> : -11,52 mm postérieur à bregma ; α : Récepteurs alpha adrénergiques ; β : Récepteurs bêta adrénergiques ; Ach : Acétylcholine ; CILM : Colonne intermédiolatérale de la moelle épinière ; Gg : Ganglion ; M<sub>2</sub> : Récepteurs muscariniques ; NA : Noradrénaline ; Amb : Noyau Ambigu ; 10 : Noyau dorsal du nerf vague ; RVL : région rostroventrolatérale du bulbe

Les neurones sympatho-excitateurs de la RVL répondent aux critères définis par Brown et Guyenet (Brown & Guyenet 1985) :

- ils sont activés par une stimulation antidromique au niveau de la CILM,
- ils déchargent de manière synchrone à l'onde de pression,
- ils sont barosensibles, c'est-à-dire inhibés lors de l'activation du baroréflexe. Le baroréflexe permet de contrebalancer toute modification de la PA basale et la RVL fait partie du circuit neuronal impliqué (Granata *et al.* 1983; Ross *et al.* 1985). Ce circuit sera décrit un peu plus tard dans le Chapitre I paragraphe I)C2).

Ces neurones sympatho-excitateurs ne constituent pas une population cellulaire homogène. Ils peuvent être classés en trois populations en fonction : de leur sensibilité à la clonidine (agoniste mixte des récepteurs  $\alpha_2$  adrénergiques et imidazoliques), de leur vitesse de conduction, et de leur rythme de décharge à des pressions artérielles basses (70 mmHg) (Sun & Guyenet 1986; Sevoz-Couche *et al.* 1998). Seule une partie de ces neurones (les neurones clonidine-insensible et à vitesse de conduction faible) semblent décharger de façon tonique *in vitro*, en absence de tout influx nerveux (Sun *et al.* 1988). Cette activité *pacemaker* intrinsèque fait de ce groupe de neurones un bon candidat comme source de l'influence sympathique tonique (Li *et al.* 1995).

Le principal neurotransmetteur libéré au niveau de la CILM par les afférences en provenance des neurones sympatho-excitateurs de la RVL semble être le glutamate (Figure 2). Cette hypothèse, proposée par Morrisson *et al.* (1991), a été confirmée par Deuchars *et al.* (1995). Ces auteurs ont montré que les potentiels post-synaptiques excitateurs (PPSE) au sein des neurones préganglionnaires sympathiques de la CILM, provoqués par une stimulation de la RVL, étaient éliminées par l'administration d'antagonistes des récepteurs ionotropiques du glutamate (Morrison *et al.* 1991; Deuchars *et al.* 1995). Toutefois, la RVL est communément appelée région C1 adrénergique, et un rôle des catécholamines dans cette neurotransmission n'est pas complètement exclu. En effet, la moitié des cellules adrénergiques de la RVL projettent sur la CILM (Tucker *et al.* 1987; Milner *et al.* 1988) et une partie des cellules glutamatergiques de la RVL exprime l'enzyme catalysant l'étape limitante de la voie de synthèse de l'adrénaline (Nosjean *et al.* 2002).

Implication de l'angiotensine II et du BDNF dans la RVL : de nombreuses études ont rapporté l'implication d'un stress oxydant au niveau central dans les pathologies cardiovasculaires, notamment dans l'hémorragie intracraniale (Heistad *et al.* 2009) et l'induction de

l'insuffisance cardiaque (Gao et al. 2004), mais aussi dans l'hypertension (Zimmerman and Davisson 2004; Peterson et al. 2006). L'origine du stress oxydant impliqué dans l'hypertension se trouve dans la RVL. En effet, l'accumulation de l'anion superoxyde dans cette région augmente l'activité vasopressive du système nerveux sympathique (Zimmerman and Davisson 2004; Peterson et al. 2006; Nagae et al. 2009; Chan et al. 2005; Chan et al. 2006). La lignée de rat SHR (modèle d'hypertension chronique) présente aussi un état de stress oxydant au niveau de la RVL, qui serait dû à un phénotype déficitaire dans la production et l'activité de l'enzyme superoxyde dismutase (SOD, enzyme antioxydante) (Chan et al. 2006). Chan et al en 2010 ont mis en évidence le rôle clé de l'angiotensine II dans cet effet (Chan et al. 2010). En effet, l'angiotensine II, par action sur les récepteurs AT<sub>1</sub> des neurones de la RVL, serait à l'origine de l'accumulation intracellulaire de l'anion superoxyde. L'action des récepteurs AT<sub>1</sub> induit une cascade d'activation aboutissant à la phosphorylation de la sous unité p47 de la NADPH oxydase. Cette phosphorylation active l'enzyme convertissant l'oxygène en anion superoxyde. Cet effet, médié par l'angiotensine II, induit une hypertension chez les rats éveillés et anesthésiés. Au sein de cette étude, cet effet a pu être prévenu par divers traitements préalable tels que des antioxydants (tempol), des antagonistes des récepteurs AT<sub>1</sub> (Losartan), ou encore un inhibiteur de la phosphorylation de la NADP oxydase. Dans ce contexte, il est important de mettre en lumière le rôle protecteur du Brain Derived Neurotrophic Factor (BDNF) au sein de la RVL. En effet, outre ses effets neurotrophiques bien connus, le BDNF joue aussi un rôle anti oxydant. L'induction de NADPH oxydase par l'angiotensine II dans le RVL est à l'origine, par la phosphorylation de la protéine CREB, d'une augmentation de l'expression du BDNF endogène. Le BDNF ainsi produit atténue la phosphorylation de la sous-unité p47 de la NADPH oxydase, et donc diminue le pouvoir d'accumulation de l'ion superoxyde, montrant une action de feedback négatif du BDNF sur le stress oxydant (Chan et al. 2010).

#### Rôle secondaire de la région rostroventromédiane du bulbe (RVM)

La RVM contient aussi des neurones sympatho-exciteurs (McCall & Clement 1989). En effet, la RVM projette vers la CILM sur les neurones sympathiques préganglionnaires et les motoneurones dans la moelle épinière. En accord avec cette donnée anatomique, les études utilisant des virus comme traceur transneuronal ont montré que les neurones sérotoninergiques et non sérotoninergiques de la RVM étaient connectés de façon oligosynaptique à de nombreuses cibles du système nerveux autonome (Mason 2001; Cano et al. 2003; Toth et al. 2006).

Plusieurs études récentes ont montré que ces cellules étaient probablement impliquées dans la régulation de la circulation cutanée (Blessing et al. 1999; Blessing & Nalivaiko 2001), notamment, après des stimuli nociceptifs (Nalivaiko & Blessing 1999) ou lors de situations de stress intense (Vianna et al. 2008).

### **3) Le système nerveux autonome parasympathique**

Les neurones préganglionnaires parasympathiques bulbaires envoient des projections cholinergiques (longues), via le nerf vague, sur les cellules ganglionnaires situées contre ou à l'intérieur de l'organe cible. Ces cellules ganglionnaires envoient à leur tour d'autres projections cholinergiques (courtes) vers les cellules cibles du myocarde. L'excitation des cellules ganglionnaires provoque donc la libération d'acétylcholine, qui vient activer des récepteurs muscariniques  $M_2$ , entraînant une bradycardie (effet chronotrope négatif) et une réduction de la contractilité (effet inotrope négatif) (voir Figure 2). Si l'on bloque ces récepteurs muscariniques, par une administration systémique d'atropine, l'activité parasympathique est totalement inhibée. On observe alors une tachycardie révélant qu'il existe, en temps normal, une influence tonique du système parasympathique sur le cœur. Cette influence résulte en majeure partie de l'activité tonique des barorécepteurs périphériques (voir paragraphe suivant).

La localisation bulbaire des neurones préganglionnaires parasympathiques reste un sujet très discuté, malgré les nombreuses études qui lui ont été consacrées. Il est généralement admis que ces neurones sont localisés dans le noyau ambigu (voir Figure 2 B1) (Stuesse 1982; Izzo et al. 1993), ainsi que dans le noyau dorsal du vague (voir Figure 2 B3) (Calaresu & Pearce 1965; Ciriello & Calaresu 1980). La fonction des neurones préganglionnaires parasympathiques dépendrait de leur origine :

- Les neurones du noyau ambigu, envoyant au cœur des fibres myélinisées, auraient une influence sur le chronotropisme (voir Figure 2 A) (McAllen & Spyer 1976; Geis et al. 1981; Jordan et al. 1982) .
- Les neurones localisés dans le noyau dorsal du vague contrôleraient (via des fibres C non myélinisées) préférentiellement l'inotropisme cardiaque (voir Figure 2 A).

Ces derniers résultats ont été obtenus à la fois chez le rat (Jordan & Spyer 1986), le chat et le chien (Geis et al. 1981). La relation entre l'origine et la fonction des neurones



préganglionnaires parasympathiques est aujourd'hui clairement établie (Massari *et al.* 1995; Blinder *et al.* 1998).

Du point de vue neurochimique, on distingue différentes classes de neurones cardiaques préganglionnaires, suivant notamment la colocalisation de l'acétylcholine avec d'autres neurotransmetteurs (Takanaga *et al.* 2003). D'ailleurs, il semble exister une relation entre les caractéristiques neurochimiques des cellules préganglionnaires parasympathiques et leur activité fonctionnelle.

La balance du SNA entre ses composantes sympathique et parasympathique peut être influencée par les réflexes cardiovasculaires, et notamment le baroréflexe.

### **C) Le baroréflexe**

Le baroréflexe est un système de régulation destiné à maintenir constante la PA (Dampney *et al.* 2002). Ce phénomène joue donc un rôle central dans l'homéostasie cardiovasculaire et agit via une modulation de l'équilibre sympathique-parasympathique.

#### **1) Rôle fonctionnel du baroréflexe**

Les barorécepteurs artériels sont situés dans la paroi des corps carotidiens et de la crosse aortique. Ces récepteurs sont sensibles à l'étirement des fibres infligé en permanence par le flux sanguin pulsé et donc par la PA. Ces tensio-récepteurs sont le point de départ d'afférences nerveuses à destination des centres bulbaires. Une augmentation de la PA accroît la fréquence de décharge de ces barorécepteurs qui, par action sur les centres bulbaires, provoque une stimulation du tonus parasympathique et une inhibition du système orthosympathique. L'augmentation de la décharge vagale induit une bradycardie, la diminution du tonus sympathique induit une baisse de la contractilité et une vasodilatation.

Lors d'une diminution de la PA, le mécanisme est inverse, par la mise au silence des barorécepteurs. Il faut souligner que la réponse vagale est immédiate (de l'ordre de 200 à 600 ms) et permet le contrôle battement par battement cardiaque de la PA, alors que la réponse sympathique est plus lente (de l'ordre de 2 à 3 secondes). Les variations spontanées de la PA induisent des modifications opposées de l'activité sympathique, permettant de maintenir des niveaux de pression adaptée. Ce mécanisme de « feed back » négatif module l'activité



rythmique cardiaque et la relation inverse entre les variations de pressions et l'activité nerveuse (Sundlöf and Wallin 1978).

La perte de fonctionnalité du baroréflexe est associée à une plus grande sévérité d'altération cardiaque (fraction d'éjection gauche altérée) ainsi qu'à la survenue d'un nombre plus important d'évènements cardiaques qui peuvent avoir un impact sur la survie des patients, tels que les arythmies ventriculaires (La Rovere et al. 1998) (La Rovere et al. 2009). Cette association délétère a aussi été démontrée dans une lignée de rats hyperanxieux (Carnevali et al. 2014). Il apparait aussi que ce paramètre est associé à la survie des patients ayant subi une ischémie cérébrale.

## 2) Voies neuronales du baroréflexe

### *(i) Convergence des afférences barosensibles dans le noyau du tractus solitaire*

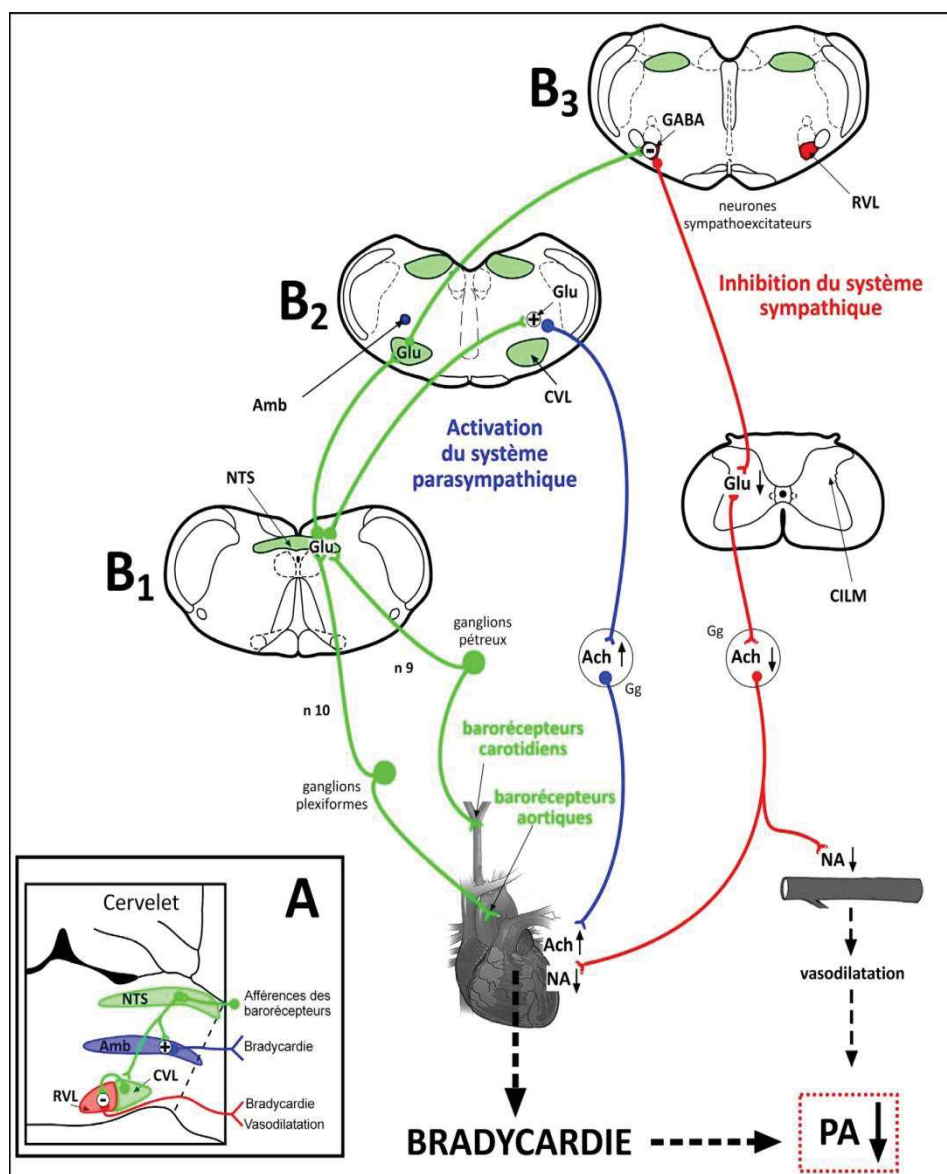
Les corps cellulaires des afférences barosensibles aortiques et sino-carotidiennes sont respectivement localisés dans le ganglion plexiforme et dans les ganglions d'Ehrentitter et Andersch. **Les fibres en provenance du ganglion plexiforme constituent le nerf aortique dépresseur qui rejoint le nerf vague (X)**, et celles en provenance des ganglions d'Ehrentitter et Andersch, plus mineures, se retrouvent dans le contingent du nerf glossopharyngien (IX). Ces deux voies convergent ensuite au niveau du noyau du tractus solitaire (NTS) (Miura and Reis 1972; Palkovits and Záborszky 1977; Kalia and Mesulam 1980; Donoghue et al. 1981; Ciriello 1983; Davies and Kalia 1981; Fan and Andresen 1998; Fan et al. 1999; Housley et al. 1987). **Le NTS est donc considéré comme le premier site central de projections des afférences des barorécepteurs et constitue le point de départ des composantes sympathique et parasympathique du baroréflexe (Figure 3A)**; il fera l'objet du prochain paragraphe. En effet, des études électrophysiologiques ont mis en évidence l'activation de certains neurones du NTS consécutivement à la stimulation des afférences barosensibles (Mifflin et al. 1988). Le principal neurotransmetteur libéré dans le NTS par les afférences barosensibles est un acide aminé excitateur (AAE), vraisemblablement le glutamate, principal neurotransmetteur contenu dans les afférences vagales et glossopharyngiennes (Reis et al. 1981; Talman et al. 1981; Talman et al. 1984; Meeley et al. 1989). De plus, après vagotomie, il a été mis en évidence une diminution de la densité des récepteurs glutamatergiques et du taux de glutamate dans le NTS (Dietrich et al. 1982; Meeley et al. 1989), et la stimulation des afférences vagales entraîne une forte augmentation de la libération de glutamate dans le NTS (Granata and Reis 1983). L'information

barosensible arrivant au NTS est transmise ensuite aux centres de contrôle du système nerveux autonome par deux voies (Figure 3A).

## ***(ii) Efférences du baroréflexe***

### ***(a) Voie d'inhibition sympathique***

L'activation du baroréflexe a pour conséquence une inhibition des neurones sympatho-excitateurs de la RVL (Granata et al. 1983; Ross et al. 1985), ceci étant à l'origine d'une vasodilatation et d'une bradycardie. En effet, l'activation des afférences baroceptives induit la stimulation au niveau du NTS des neurones excitateurs qui projettent sur la région caudo-ventrolatérale (CVL) du bulbe (Figure 3B1 & 3B2) (Ross et al. 1985; Aicher et al. 1995; Kubo and Kihara 1991; Somogyi et al. 1989), région noradrénergique appelée A1. La libération de glutamate dans cette région active des neurones GABAergiques projetant et inhibant les neurones sympatho-excitateurs de la RVL (Minson et al. 1997; Chan and Sawchenko 1998; Agarwal and Calaresu 1991; Cravo and Morrison 1993; Jeske et al. 1995). La composante sympathique du baroréflexe peut être bloquée soit par l'injection dans la CVL d'un antagoniste des récepteurs ionotropiques du glutamate (l'acide kynurénique) (Guyenet et al. 1987), soit par l'injection dans la RVL d'un antagoniste des récepteurs GABA<sub>A</sub> (Verberne and Guyenet 1992). Comme les neurones sympatho-excitateurs de la RVL projettent ensuite vers la CILM où se trouvent les neurones préganglionnaires sympathiques (voir chapitre précédent) (Bernstein-Goral and Bohn 1989; Deuchars et al. 1997; Minson et al. 1997; Reis et al. 1989; Oshima et al. 2006), le baroréflexe est donc un mécanisme de feedback négatif qui permet de diminuer la PA via une inhibition de l'activité sympathique.



**Figure 3: Schéma récapitulatif des voies bulbaires du baroréflexe**

B1 : -14,00 mm ; B2 : -13,00 mm ; B3 : -12,12 mm postérieur à Bregma ; n 9 : nerf glossopharyngien ; n 10 : nerf, Ach : Acétylcholine ; CILM : Colonne intermédiolatérale de la moelle épinière ; CVL : région caudoventrolatérale du bulbe ; GABA : acide gamma-amino-butyrique ; Gg : Ganglion ; Glu : glutamate ; NA : Noradrénaline ; Amb : Noyau Ambigu ; NTS : noyau du tractus solitaire ; RVL : région rostroventrolatérale du bulbe

*(b) Voie d'activation parasympathique*

Outre la voie d'inhibition sympathique, le baroréflexe active en parallèle le tonus parasympathique. En effet, les neurones glutamatergiques du NTS activés lors du baroréflexe projettent également sur une autre région du bulbe, le noyau ambigu, comme nous l'avons

mentionnée ci-dessus dans le chapitre sur le SNA (Figure 3B1 et 3B2). C'est dans cette région qu'est localisée la majorité des neurones pré-ganglionnaires parasympathiques à destination du cœur et à l'origine de la libération d'acétylcholine dans le cœur, assurant ainsi la composante parasympathique (bradycardie) du baroréflexe (Guyenet et al. 1987; McAllen and Spyer 1978; Spyer 1994). Par ailleurs, les études de Neff et al., 1998 ont montré la participation de récepteurs NMDA et non-NMDA dans l'excitation des neurones du noyau ambigu par les afférences barosensibles en provenance du NTS (Neff et al. 1998).

La première cible centrale des barorécepteurs est donc le NTS. Ce noyau représente donc la zone d'intégration des messages en provenance de la périphérie, et c'est donc à ce niveau qu'existe un lieu privilégié de modulation des réflexes cardiovasculaires, dont le baroréflexe que nous venons de voir mais aussi le chémoréflexe carotidien (qui sera abordé dans la Physiologie de la respiration, Chapitre I paragraphe II)).

### ***(iii)Le noyau du tractus solitaire***

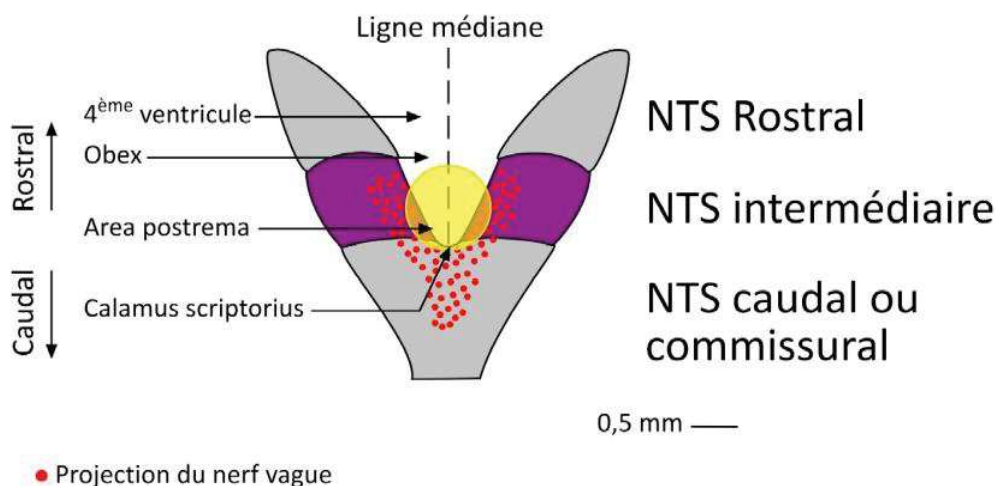
#### ***(a) Anatomie du noyau du tractus solitaire***

Le NTS est une structure bulbaire complexe, de petite taille (entre 3 et 4 mm<sup>3</sup>) chez le rat (Palkovits & Zaborszky, 1977), contenant un nombre limité de neurones (environ 40000) de formes très variées (étoilées, fusiformes, ovoïdes, triangulaires, ...). La distribution et l'organisation de ces cellules et des fibres axonales ne sont pas homogènes dans ce noyau, et celui-ci a donc été divisé, sur le plan cytoarchitectural, en plusieurs sous-noyaux.

Aujourd'hui, il est généralement admis qu'il existe trois sous-noyaux au sein du NTS (Figure 4): on distingue ainsi le NTS rostral, intermédiaire et caudal ou commissural. Les deux sous-noyaux antérieurs (NTS rostral et intermédiaire) sont eux-mêmes subdivisés en deux parties, médiane et latérale (Cottle, 1964; Miura & Reis, 1972; Chiba & Doba, 1975).

- Le NTS rostral est formé de deux colonnes cellulaires qui encadrent le 4ème ventricule. Il s'étend du pôle caudal du nerf facial au pôle rostral de l'area postrema (l'obex).
- Le NTS intermédiaire est également formé de deux colonnes cellulaires. Il s'étend depuis l'obex jusqu'au calamus scriptorius (limite caudale de l'area postrema).

- Le NTS commissural est un noyau unique formé par la réunion, au niveau du calamus scriptorius, des NTS intermédiaires droit et gauche. Il s'étend depuis le calamus scriptorius jusqu'à la décussation pyramidale, et reçoit les afférences vagales qui véhiculent notamment les informations en provenance des barorécepteurs aortiques.



**Figure 4: Localisation du noyau du tractus solitaire**

Vue sagittale et dorsale du NTS avec ses divisions anatomiques et les principaux sites de projection des afférences vagales

*(b) Histologie du noyau du tractus solitaire*

Comme nous l'avons signalé précédemment, la population neuronale du NTS est assez hétérogène aussi bien au niveau de la taille que de la forme. Sur le plan ultrastructural, ce noyau se caractérise par une densité élevée de jonctions synaptiques axo-dendritiques (les plus nombreuses) et axo-somatiques (Takahashi et al., 1980). Cependant, des jonctions axo-axoniques, dendro-dendritiques et dendro-somatiques ont été également décrites dans le NTS (Takahashi et al., 1980; Leslie et al., 1982; Kalia & Richter, 1988).

Le NTS présente des arrangements synaptiques complexes en forme de glomérules, impliquant plusieurs terminaisons sur un même profil dendritique ou un axone en contact jonctionnel avec plusieurs dendrites (Chiba & Doba, 1975). Ces glomérules forment ainsi un support pour les mécanismes complexes de communication intercellulaire dans ce noyau. Cette organisation structurale suggère que, dans le NTS, les mécanismes pré-synaptiques doivent jouer un rôle important dans le contrôle de la communication intercellulaire.

(c) Afférences et efférences du noyau du tractus solitaire

*Afférences d'origine périphérique*

En plus des afférences vagales (X) et glossopharyngiennes (IX) (Hayakawa et al. 2005), le NTS reçoit des afférences du nerf trijumeau (V) et facial (VII) (Torvik, 1956). Ces afférences sont organisées selon une topographie précise : les afférences des nerfs V et VII projettent préférentiellement dans le NTS rostral, celles des nerfs IX et X dans le NTS intermédiaire alors que le NTS commissural est le site de projection privilégié des fibres du nerf X. Cependant, les zones de projections ne sont pas délimitées aussi nettement les unes des autres et un certain chevauchement existe au niveau rostro-caudal (Contreras *et al.*, 1980). Il reste que la distinction entre les parties latérales et médianes correspond à une réalité physiologique car les afférences trigéminales, faciales et glossopharyngiennes projettent préférentiellement dans la partie latérale du NTS, alors que les afférences vagales se distribuent surtout dans la partie médiane (Contreras *et al.*, 1980). Les autres afférences périphériques que reçoit le NTS projettent également selon une topographie définie. En effet, certaines afférences rénales (principalement celles qui sont myélinisées) se terminent dans le NTS commissural (Simon & Schramm, 1984; Wyss & Donovan, 1984). Les afférences gustatives et somatiques provenant de la région oropharyngée innervent surtout la partie rostrale du NTS alors que les afférences viscérales des systèmes digestifs, respiratoire et rénal projettent au niveau caudal.

*Afférences et efférences d'origine centrale*

Le NTS reçoit et envoie des projections réciproques sur la plupart des structures du système nerveux central (Jean, 1991). Il existe de nombreux liens directs avec les structures bulbo-ponto-mésencéphaliques (noyau parabrachial, noyau moteur des différents nerfs crâniens, formation réticulée ventrolatérale, noyau du raphé, noyau rétrotapezoïde (RTN)...) (Kalia et al., 1979; Ross et al., 1984; Portillo & Pasaro, 1987; Takakura et al. 2006). Par ailleurs, le NTS établit des connexions directes plus longues avec les structures diencéphaliques et télencéphaliques dont l'hypothalamus, et certaines structures limbiques dont le noyau central du complexe amygdalien (Ricardo & Koh, 1978). Le NTS rostral envoie des projections bilatérales sur les noyaux latéral et dorsal de l'hypothalamus, alors que le NTS caudal et intermédiaire projette sur les noyaux paraventriculaires dorsomédians et arqués, ainsi qu'à l'aire préoptique médiane (Ricardo & Koh, 1978; Ciriello & Calaresu, 1980). Réciproquement, l'hypothalamus, aussi bien antérieur que postérieur, est à l'origine de nombreuses projections sur le NTS, les projections les plus denses provenant de l'hypothalamus postérolatéral, du noyau paraventriculaire (Ricardo & Koh, 1978). Le noyau parabrachial est aussi impliqué dans les projections réciproques avec le NTS, ce noyau étant

le principal relais des projections ascendantes du NTS. Enfin, il existe des projections réciproques entre le NTS commissural et le noyau raphé magnus (RMg), le noyau raphé dorsalis (Thor & Helke, 1987, 1989). Par ailleurs, il faut noter l'existence de projections directes du NTS rostral et caudal vers le cervelet (Paton & Spyer, 1990).

Comme je l'ai mentionné précédemment (Voir chapitre I paragraphe I)C)1)(i)(c)), du NTS part une projection descendante majeure sur les neurones préganglionnaires parasympathiques, localisés dans le noyau ambigu et le noyau moteur dorsal du vague. Egalement, le NTS projette sur la CVL et la RVL (Figure 3).

#### *(d) Neuromédiateurs du noyau du tractus solitaire et contrôle cardiovasculaire*

L'utilisation de techniques biochimiques, immunologiques et pharmacologiques, a permis de montrer qu'une quarantaine de substances neuroactives environ est présente dans cette structure (Palkovits & Zaborszky 1977). Nombre de ces neuromédiateurs semblent impliqués dans la régulation de la PA. **Dans ce mémoire, je me contenterai d'aborder les neuromédiateurs qui ont fait l'objet d'études approfondies dans la régulation du baroréflexe et donc de la PA: le glutamate, le GABA, la sérotonine, la substance P et l'angiotensine.**

##### *Le glutamate*

Le glutamate est le principal neurotransmetteur contenu dans les afférences vagales et glossopharyngiennes (Reis et al. 1981; Talman et al. 1981; Meeley et al. 1989). De fait, après vagotomie, le nombre de récepteurs glutamatergiques et le taux de glutamate dans le NTS diminuent (Dietrich et al. 1982; Lewis et al. 1988; Meeley et al. 1989). Par ailleurs, chez l'animal intact, la stimulation des afférences vagales entraîne la libération de glutamate au niveau du NTS (Granata & Reis 1983).

En fonction du site d'injection, la microinjection de glutamate dans le NTS entraîne des réponses différentes. Au niveau du NTS intermédiaire ou dans la partie latérale du NTS commissural, le glutamate provoque une hypotension et une bradycardie (Reis et al. 1981). En revanche, lorsque la microinjection de glutamate est faite au niveau de la partie médiane du NTS commissural, elle entraîne une hypertension (Colombari et al. 1994; Colombari et al. 1996).

La transmission des messages issus des afférences cardiovasculaires se fait principalement via des récepteurs ionotropiques (Guyenet et al. 1987; Vardhan et al. 1993b; 1993a; Zhang & Mifflin 1993). Le débat reste toutefois ouvert sur l'importance relative des récepteurs NMDA



et non-NMDA dans cette transmission (Kubo & Kihara 1988; Gordon & Leone 1991; Vardhan et al. 1993b; 1993a; Ohta & Talman 1994; Haibara et al. 1995; Aylwin et al. 1997; Dean et al. 1998; Zhang & Mifflin 1998; Machado et al. 2000; N'Diaye et al. 2001). Par ailleurs, la participation des récepteurs métabotropiques ne doit pas être écartée puisque, l'administration intra-NTS d'agonistes de ces récepteurs entraîne des réponses similaires à celles du baroréflexe (Machado & Bonagamba 1998; Viard & Sapru 2002). Cependant le blocage de ces récepteurs métabotropiques n'altère pas le baroréflexe (Antunes & Machado 2003).

### *Le GABA*

L'innervation GABAergique du NTS est principalement d'origine intrinsèque. En effet, une densité importante de corps cellulaires GABAergiques a été mise en évidence dans les parties médiane, dorsale et commissurale du NTS (Dietrich *et al.* 1982; Meeley *et al.* 1985), ainsi que dans le NTS rostral (Lasiter & Kachele 1988).

La microinjection dans le NTS d'agonistes des récepteurs GABA provoque une élévation de la PA et une tachycardie (Bousquet *et al.* 1982; Sved & Sved 1989; Florentino *et al.* 1990; Sved & Sved 1990; Sved & Tsukamoto 1992; Callera *et al.* 1999; 2000). Il a été suggéré que cet effet presseur, dépendant d'un mécanisme GABAergique, est la conséquence d'une inhibition de l'effet tonique cardiomodérateur du baroréflexe. En accord avec cette hypothèse, la stimulation des récepteurs GABAergiques du NTS supprime la bradycardie du baroréflexe aussi bien chez le rat anesthésié qu'éveillé (Bousquet *et al.* 1982; Sved & Tsukamoto 1992; Okada & Bunag 1995; Callera *et al.* 2000). De plus, les neurones du NTS, activés par la stimulation du nerf aortique dépresseur ou du nerf du sinus carotidien, sont inhibés par l'administration microiontophorétique de GABA (Mifflin *et al.* 1988).

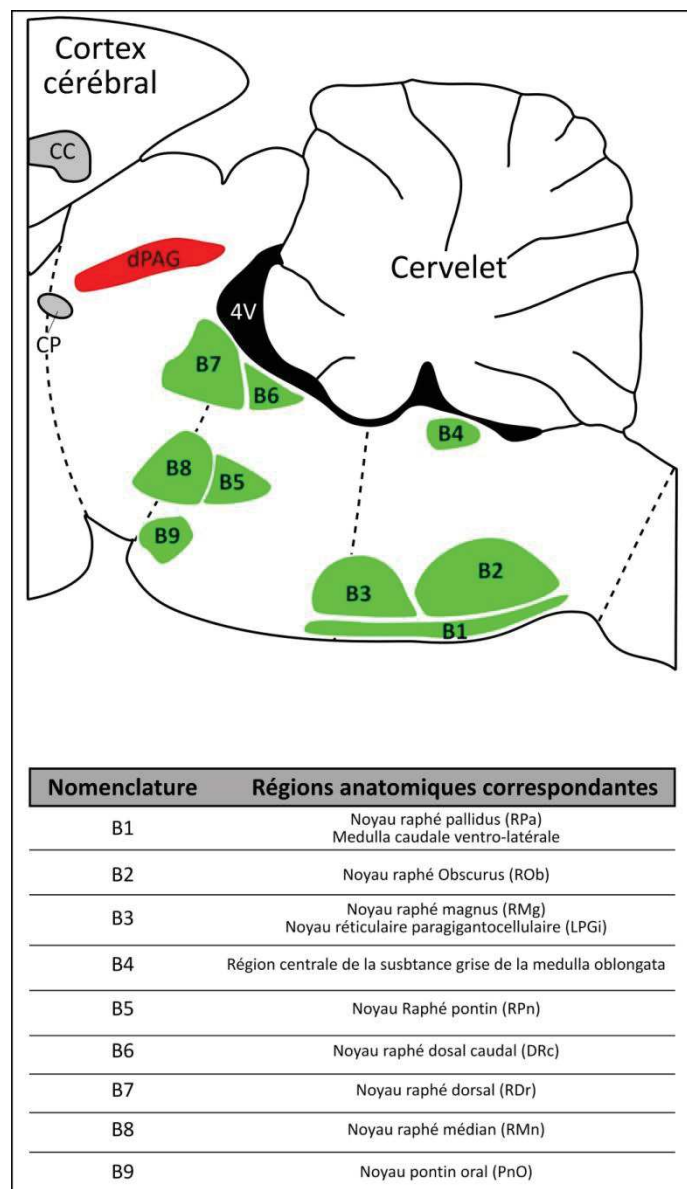
### *La sérotonine*

Le NTS ne possède pas de cellules synthétisant la sérotonine (Maley and Elde 1982; Nosjean, et al. 1987) mais possède une forte innervation sérotoninergique exogène d'origine centrale et périphérique (Fuxe 1965; Steinbusch et al. 1981; Maley and Elde 1982; Nosjean et al. 1987). Les afférences sérotoninergiques périphériques du NTS ont pour origine le ganglion plexiforme (Gaudin-Chazal et al. 1983; Nosjean et al. 1990) et les afférences sérotoninergiques d'origine centrale proviennent de plusieurs des noyaux du raphé (Thor and Helke 1987; Schaffar et al. 1988)



De façon schématique, deux sous-ensembles de neurones sérotoninergiques du raphé peuvent être distingués par leurs efférences, les neuromédiateurs qu'ils coexpriment et, en partie, par leurs rôles fonctionnels (Figure 5):

- 1) L'« ensemble antérieur » comprend les neurones sérotoninergiques des groupes B4 à B9 qui projettent principalement rostralement.
- 2) L'« ensemble postérieur » inclut les neurones sérotoninergiques des groupes B1 à B3 qui projettent, soit localement au niveau du tronc cérébral, soit caudalement vers la moelle épinière (Kwiat & Basbaum 1992). Au niveau bulbaire, on trouve essentiellement le groupe B3 qui correspond au RMg et déborde largement dans le LPGi (qui nous intéresse plus spécialement). Les neurones sérotoninergiques du groupe B1 (raphé pallidus) sont localisés ventralement le long de la ligne médiane et se trouvent pour partie au même niveau rostrocaudal que ceux du groupe B3. Le noyau raphé obscurus (B2) s'étend caudalement et dorsalement par rapport au RMg. Au niveau de la RVM (B3 + partie du B1), ce sont essentiellement les neurones sérotoninergiques du raphé magnus qui ont été étudiés.



**Figure 5 : Noyaux du raphé**

Représentation schématique d'une coupe sagittale de cerveau de rat sur laquelle ont été dessinés les différents noyaux du raphé contenant les somas des neurones sérotoninergiques. Ces groupes de neurones sont notés de B1 à B9 selon l'axe caudo-rostral (Dahlström et Fuxe, 1964). Une portion de la colonne dorsale de la substance grise périaqueducale (dPAG) a été représentée pour situer l'axe « PAG-RVM/B3 ».

4V : 4ème ventricule ; CC : Corps calleux ; CP : Commissure postérieure

Les neurones du groupe B3 envoient des projections collatérales dans plusieurs régions du tronc cérébral (Gao & Mason 1997; 2001) et notamment vers le NTS (Thor & Helke 1987; Schaffar *et al.* 1988). La destruction des terminaisons sérotoninergiques du NTS par la microinjection locale bilatérale de la neurotoxine spécifique 5,7-dihydroxytryptamine (5,7-

DHT) entraîne, chez le rat vigile, une élévation de la PA qui dure plusieurs jours mais n'affecte ni la variabilité de la PA, ni la FC (Orer et al. 1991). Ce résultat est retrouvé uniquement lors des lésions spécifiques des afférences périphériques mais pas centrales et sont semblables à ce qui est observé après la dénervation spécifique des afférences des barorécepteurs : une importante hypertension transitoire et une augmentation durable de la variabilité de la PA (Norman et al. 1981; Orer et al. 1991).

La microinjection de sérotonine dans le NTS provoque des effets cardiovasculaires qui varient en fonction de la dose administrée, probablement via l'activation de différents récepteurs.

- A des doses picomolaires, la sérotonine induit une facilitation de la composante cardio-vagale du baroréflexe (N'Diaye et al. 2001) amenant à une hypotension et une bradycardie (Laguzzi et al. 1984; Merahi et al. 1992).
- A des doses nanomolaires, elle provoque au contraire une inhibition du baroréflexe (Merahi et al. 1992), associée à une élévation dose-dépendante de la PA, mais sans affecter de manière significative la FC (Wolf et al. 1981; Merahi et al. 1992; Tsukamoto et al. 2000).

Ces résultats suggèrent que la sérotonine, au niveau du NTS, pourrait exercer différents effets cardiovasculaires, probablement via l'activation de différents récepteurs.

Au niveau du NTS, de nombreuses études électrophysiologiques, pharmacologiques et immunohistochimiques, ont permis d'identifier une grande densité de récepteurs 5-HT<sub>3</sub> (Pratt and Bowery 1989; Glaum et al. 1992; Merahi et al. 1992; Sévoz et al. 1996), 5-HT<sub>1</sub> (D. Hoyer et al. 1986; Manaker and Verderame 1990), 5-HT<sub>2</sub> (Pazos et al. 1985; Merahi et al. 1992; Sévoz-Couche et al. 2000a; Sévoz-Couche et al. 2000b; Huang and Pickel 2002), 5-HT<sub>4</sub> (Edwards and Paton 1999) et 5-HT<sub>7</sub> (Gustafson et al. 1996).

Les récepteurs 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>2A</sub> et 5-HT<sub>3</sub> étant impliqués dans le contrôle central de la PA, leur rôle sera détaillé ci-après. Les récepteurs 5-HT<sub>3</sub> étant au centre de mes travaux de thèse, une attention particulière y sera portée.

#### *Les récepteurs 5-HT<sub>1A</sub>*

Les récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> appartiennent à la superfamille des récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplés à une protéine G spécifique (RCPG).

L'administration i.p. ou i.c.v. de divers agonistes et antagonistes des récepteurs sérotoninergiques montre clairement que les récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> jouent un rôle majeur dans la régulation des paramètres cardiovasculaires. En effet, l'activation des récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> induit une hypotension et une bradycardie chez l'animal anesthésié (Ramage 2001) et

potentialise la réponse cardiaque du baroréflexe chez le rat (Fletcher et al. 1996; Dando et al. 1998). À l'opposé, le blocage de ces récepteurs, par l'administration centrale d'un antagoniste spécifique, inhibe la composante parasympathique du baroréflexe, mais n'affecte ni la valeur basale de la PA, ni la FC (Skinner et al. 2002).

### *Les récepteurs 5-HT<sub>2</sub>*

Les récepteurs 5-HT<sub>2</sub> appartiennent également à la superfamille des récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplés à une protéine G spécifique (RCPG).

La microinjection d'agonistes sélectifs des récepteurs 5-HT<sub>2</sub> dans le NTS entraîne les mêmes réponses cardiovasculaires (hypotension et bradycardie) que la microinjection de doses picomolaires de sérotonine (Merahi et al. 1992). Cependant, ces effets cardiovasculaires étant inchangés après une vagotomie, on peut penser que les récepteurs 5-HT<sub>2</sub> du NTS impliqués sont post-synaptiques (Merahi et al. 1992).

L'activation des récepteurs 5-HT<sub>2B</sub> du NTS n'induit pas de modifications des paramètres cardiovasculaires de base et leur blocage spécifique n'affecte pas les effets cardiovasculaires de doses picomolaires de sérotonine (Raul 2003). Il est donc très probable que seuls les récepteurs 5-HT<sub>2A</sub> soient responsables de la diminution de la FC et de la PA, obtenue par la microinjection de sérotonine ou d'agonistes non sélectifs des récepteurs 5-HT<sub>2</sub> dans le NTS. En effet, l'activation spécifique des récepteurs 5-HT<sub>2A</sub> (contrairement à celle des récepteurs 5-HT<sub>2B</sub> et 5-HT<sub>2C</sub>) induit une hypotension qui implique l'inhibition des neurones sympatho-excitateurs de la RVL (Comet et al. 2007).

De plus, l'enregistrement in vivo des neurones du NTS recevant des afférences baroréceptives a montré que l'application microiontophorétique d'agonistes spécifiques des récepteurs 5-HT<sub>2A</sub> induit une excitation des neurones du NTS impliqués dans la production des réponses cardiovasculaires du baroréflexe (et pourraient exercer une facilitation de ce réflexe), alors que l'activation des récepteurs 5-HT<sub>2C</sub> les inhibe (Sévoz-Couche et al. 2000a). Cette hypothèse est soutenue par le fait que la stimulation des récepteurs 5-HT<sub>2A</sub> facilite la réponse bradycardique obtenue par la microinjection d'acides aminés excitateurs (mimant le circuit du baroréflexe) dans le NTS (N'Diaye et al. 2001).

### *Les récepteurs 5-HT<sub>3</sub>*

Le récepteur 5-HT<sub>3</sub> est le seul récepteur sérotoninergique qui appartient à la superfamille des récepteurs ionotropiques. Le NTS est la structure du système nerveux central présentant la

plus grande densité de récepteurs 5-HT<sub>3</sub> (Pratt et al. 1990; Laporte et al. 1992; Ohuoha et al. 1994).

Les afférences du NTS provenant du ganglion plexiforme expriment les sous-unités 5-HT<sub>3A</sub> et 5-HT<sub>3B</sub> (Morales and Wang 2002). L'ablation unilatérale de ce ganglion provoque la disparition de la presque totalité des récepteurs 5-HT<sub>3</sub> dans le NTS ipsilatéral (Pratt and Bowery 1989; Merahi et al. 1992) indiquant leur localisation présynaptique sur ces afférences. Ces afférences étant glutamatergiques, l'activation des récepteurs 5-HT<sub>3</sub> du NTS potentialise la libération de glutamate (Ashworth-Preece et al. 1995). De même, l'activation des neurones du NTS recevant des afférences vagales, par des agonistes des récepteurs 5-HT<sub>3</sub>, implique l'activation de récepteurs ionotropiques du glutamate (Jeggo et al. 2005).

La microinjection d'agonistes sélectifs des récepteurs 5-HT<sub>3</sub> provoque les mêmes réponses cardiovasculaires que des doses nanomolaires de sérotonine: une inhibition de la composante parasympathique du baroréflexe et une élévation de la PA (Merahi et al. 1992). Ces réponses sont prévenues par la microinjection préalable d'antagonistes spécifiques des récepteurs 5-HT<sub>3</sub>, mais pas celle d'antagonistes des autres récepteurs sérotoninergiques (Merahi and Laguzzi 1995; Callera et al. 1997; Sevoz et al. 1997; Nosjean et al. 1998; Sévoz-Couche et al. 1998; Bonagamba et al. 2000). L'inhibition de la bradycardie du baroréflexe a été observée aussi bien sous anesthésie (Merahi et al. 1992) que chez le rat éveillé (Callera et al. 1997). Les deux effets, induits par l'activation des récepteurs 5-HT<sub>3</sub> du NTS, sont sous-tendus par deux circuits distincts:

- L'inhibition cardio-vagale implique l'activation d'un interneurone GABAergique dans le NTS inhibant le neurone de deuxième ordre du circuit du baroréflexe (Merahi et al. 1992), bloquant l'information baroceptive vers le noyau ambigu. Il existe en fait deux circuits impliqués dans l'inhibition de la réponse cardiaque du baroréflexe en fonction du groupe de barorécepteurs impliqué (Comet et al. 2005): Soit des interneurones substance P-ergiques sont activés, et la substance P active alors des récepteurs NK1 localisés sur des neurones GABAergiques qui inhibent secondairement les cellules recevant les afférences polysynaptiques en provenance des barorécepteurs aortiques ; soit des interneurones GABAergiques sont activés et le GABA libéré active des récepteurs GABA<sub>A</sub> localisés sur les neurones recevant des afférences provenant des barorécepteurs carotidiens.
- L'élévation de PA résulte de l'activation de neurones glutamatergiques du NTS, qui vont à leur tour stimuler des neurones sympatho-excitateurs clonidine-sensibles, mais

non catécholaminergiques, de la RVL. En fait, la stimulation des récepteurs 5-HT<sub>3</sub>, en position pré-synaptique par rapport aux afférences vagales, provoque, via la libération de glutamate et l'activation des récepteurs ionotropiques de cet acide aminé, l'activation NO-dépendante d'un groupe de neurones qui semblent être le point de départ d'une voie sympathoexcitatrice. Cette hypothèse est fondée sur les données suivantes :

- Au niveau du NTS :
  - La microinjection préalable d'antagonistes des récepteurs ionotropiques du glutamate dans le NTS prévient l'effet presseur provoqué par l'activation des récepteurs 5-HT<sub>3</sub> (Sévoz-Couche et al. 2002).
  - Dans certains neurones du NTS, les récepteurs ionotropiques du glutamate coexistent avec la NO synthase (Ellrich et al. 2001) et donc leur activation provoque la production locale de monoxyde d'azote (NO) (Olausson et al. 2008). La microinjection préalable d'un inhibiteur de la NO synthase, ou de la guanylyl cyclase, dans le NTS, bloque l'effet presseur normalement évoqué par l'activation des récepteurs 5-HT<sub>3</sub> (Sévoz-Couche et al. 2002). Le NO produit a un rôle de potentialisation à long terme de la transmission synaptique par action au niveau présynaptique afin d'augmenter le glutamate libéré.
- Au niveau de la RVL :
  - L'activation des récepteurs 5-HT<sub>3</sub> du NTS provoque une élévation de l'activité sympathique (Nosjean et al. 1995).
  - Le blocage des récepteurs ionotropiques glutamatergiques au niveau de la RVL, par la microinjection locale d'acide kynurénique, abolit l'effet presseur de l'activation des récepteurs 5-HT<sub>3</sub> du NTS (Sévoz et al. 1996).
  - La stimulation des récepteurs 5-HT<sub>3</sub> du NTS augmente fortement le nombre de neurones c-fos positifs dans la RVL ; ces neurones n'expriment pas la tyrosine hydroxylase, et sont donc exclusivement non-catécholaminergiques (Sévoz et al. 1996).
  - Deux groupes de neurones sympatho-excitateurs « clonidine-sensibles » de la RVL, ayant des vitesses de conduction différentes, constitueraient cette population de neurones c-fos positifs (Sévoz-Couche et al. 1998).

En conclusion, les réponses cardiovasculaires induites par la stimulation des récepteurs 5-HT<sub>3</sub>, au niveau du NTS, semblent impliquer deux groupes distincts de ces récepteurs. Ils

seraient tous deux localisés en position présynaptique sur les afférences vagales. Un groupe serait responsable de l'effet presseur via l'activation de neurones qui se projettent sur la RVL, tandis que l'autre interviendrait dans l'inhibition de la bradycardie du baroréflexe via l'activation glutamatergique d'un système GABAergique local.

### *L'angiotensine*

Depuis la découverte de la présence de ses récepteurs au niveau du NTS (Diz et al. 1986), le rôle intrinsèque de l'angiotensine II sur les neurones de cette région a fait l'objet de beaucoup de travaux. La distribution de ces récepteurs spécifiques de l'angiotensine II est à la fois présynaptique, notamment sur les afférences vagales (Speth et al. 1987; Lewis et al. 1986; Healy et al. 1989), et post-synaptique (Campagnole-Santos et al. 1990; Szigethy et al. 1992; Qu et al. 1996). La microinjection d'angiotensine II au niveau du NTS a pour effet d'inhiber le baroréflexe cardiaque (Casto and Phillips 1986; Paton and Kasparov 1999; Paton et al. 2001), et cette action est médiée par les récepteurs AT<sub>1</sub> (Allen et al. 1988) couplée avec une activation de la NO synthase présente dans les neurones du NTS (Waki et al. 2003). D'autre part, l'angiotensine II dans le NTS induit une augmentation de la PA, (Diz and Pirro 1992), associée à une augmentation de la production intracellulaire de la substance P (Barnes et al. 1991; Diz and Pirro 1992; Diz et al. 1997; Diz et al. 1998).

### **3) Méthode d'analyse du baroréflexe**

La sensibilité du baroréflexe artériel peut être évaluée par plusieurs techniques, l'approche la plus commune consiste en l'injection de médicaments vasoactifs (nitroprussiate ou phényléphrine). D'autres techniques explorent également la sensibilité du baroréflexe à partir de l'analyse des variations spontanées de la PA (Laude et al. 2009).

#### ***(i) Analyse du baroréflexe spontanée***

Le baroréflexe spontané peut être analysé de différentes façons.

Tout d'abord, **la méthode des séquences** peut être utilisée (Laude et al. 2004) : le principe de base est que l'on estime la pente entre les changements de rythme cardiaque associés aux changements de PA, ceci donnant un index de barosensibilité (BRS). Plusieurs procédures peuvent être appliquées, selon l'utilisation de la PA systolique ou de la PA moyenne pour les paramètres de pression, et selon l'utilisation de l'intervalle de temps entre deux battements cardiaques, de la FC ou de l'intervalle de temps entre deux contractions systoliques). Par convention, il a été fixé que les changements devaient être au minimum de 1 mmHg entre

deux valeurs de PA et 5 ms pour l'intervalle de temps pour qu'ils puissent être pris en compte (Laude et al. 2004). D'autres validations de procédures sont basées sur un coefficient de corrélation entre PA et intervalle R-R qui doit être au minimum de 0.7, et enfin les rampes de variation cardiaque doivent être d'au minimum 3 voire 4 battements successifs pour qu'une séquence soit validée.

D'autre part, d'autres méthodes très utilisées sont basées sur des procédures dérivées de **l'analyse spectrale de la VFC** (voir chapitre I, paragraphe I, D)), qui reposent sur une fonction de cohérence et une fonction de transfert. La fonction de cohérence, comprise entre 0 et 1, quantifie la force du couplage linéaire entre les variables d'entrée et de sortie. La fonction de transfert est, elle, constituée par : 1/ une fonction de gain qui correspond au module de la fonction de transfert, exprimée en unité du signal de sortie par unité du signal d'entrée et, 2/ une fonction de phase dont la valeur, comprise entre  $-\pi$  et  $\pi$  (ou  $-180^\circ$  et  $180^\circ$ ), quantifie en fonction de la fréquence le déphasage entre les deux signaux, c'est-à-dire indique la fraction de période de laquelle les signaux sont décalés. Certaines procédures d'estimation du BRS utilise le calcul du gain de la fonction de transfert entre PA et intervalle R-R dans les bandes LF et HF (Robbe et al. 1987).

### ***(ii) Analyse du baroréflexe Pharmacologique***

L'activation du baroréflexe peut aussi être induite pharmacologiquement par l'administration intra-veineuse d'un agent hypotenseur (nitroprussiate) suivi de phényléphrine (PE, 10  $\mu\text{g/kg}$ ). La PE en agissant sur les récepteurs adrénergiques des vaisseaux provoque une élévation importante de la PA, ce qui engendre une réponse baroréflexe cardiaque sous la forme d'une diminution de la FC. Le logiciel PRISM (GraphPad Prism version 5.00, San Diego California USA) permet la création d'une courbe sigmoïde, rendant compte de la baisse de FC induite par l'élévation de PA, selon l'équation de Boltzmann:

$$Y = \text{Bottom} + (\text{Top}-\text{Bottom}) / (1+\exp((V50-X)/\text{Slope}))$$

Une régression linéaire de la partie rectiligne de cette courbe permet de déterminer la sensibilité du baroréflexe pharmacologique. Plus la pente est élevée, plus le baroréflexe est fonctionnel.

Le SNA, et notamment le baroréflexe, influence la FC et en particulier la variabilité de ce paramètre.



## D) Variabilité de la fréquence cardiaque

### 1) Généralités

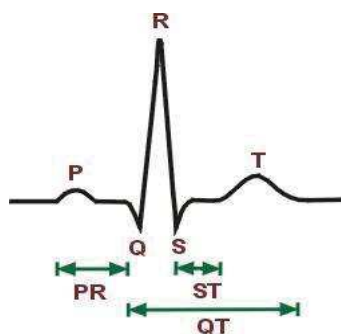
#### *L'activité cardiaque :*

Le cœur est formé de deux compartiments bien distincts : le cœur droit constitué de l'oreillette droite et du ventricule droit, qui communiquent via l'orifice tricuspide, et le cœur gauche constitué de l'oreillette gauche et du ventricule gauche qui communiquent entre eux par l'orifice mitral. Les oreillettes droites et gauches sont séparées par une cloison appelée septum interauriculaire et les ventricules par le septum interventriculaire.

Le tissu nodal, localisé au niveau de l'oreillette droite, donne naissance aux impulsions électriques puis les conduit à grande vitesse vers les cellules myocardiques, engendrant ainsi les contractions auriculaires et ventriculaires. Le cœur est donc le siège de contractions, appelées systoles, et de relâchements, appelés diastoles. Ce tissu nodal (en particulier le nœud sinusal) confère une activité automatique au cœur permettant au cœur de continuer de battre même s'il est isolé de l'organisme, à condition d'être dans des conditions physiologiques convenables.

#### *Description d'un cycle cardiaque :*

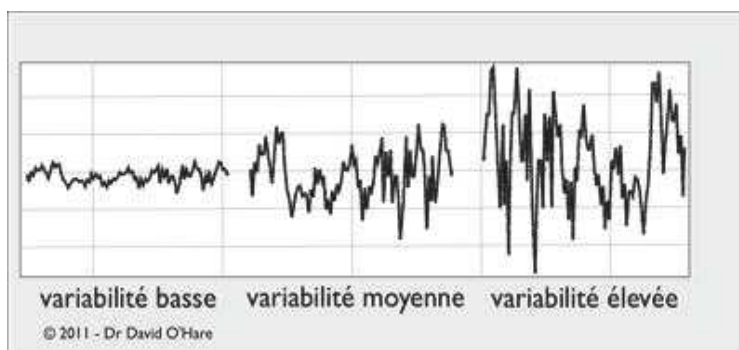
La révolution cardiaque dure environ 1,1 seconde chez l'humain. Elle correspond à l'ensemble des phénomènes électriques, mécaniques et pressifs qui surviennent pendant une systole et une diastole. Un électrocardiogramme (ECG) correspond à l'enregistrement de l'activité électrique du cœur, nécessaire à ses contractions. Dans un tracé typique, on peut remarquer cinq ondes caractéristiques, appelées P, Q, R, S et T (Figure 6). L'onde P marque la dépolarisation lors de la contraction des oreillettes (systole auriculaire) ; l'intervalle PR indique le temps nécessaire à la **transmission de l'influx électrique du nœud sinusal des oreillettes jusqu'au nœud auriculo-ventriculaire**; le complexe QRS marque la dépolarisation et la contraction ventriculaire (systole ventriculaire) ; l'intervalle QT correspond à la repolarisation ventriculaire globale ; l'onde T désigne la fin de la repolarisation ventriculaire. L'onde de repolarisation des oreillettes est noyée dans la dépolarisation des ventricules. L'ECG permet donc de suivre les événements électriques du myocarde.



**Figure 6 :** Les différentes périodes et ondes PQRST d'un électrocardiogramme (ECG)

*La variabilité de la fréquence cardiaque :*

Le rythme cardiaque n'évolue pas d'une manière constante au cours du temps, il existe une fluctuation battement par battement. Cette fluctuation appelée la **variabilité de la fréquence cardiaque (VFC)** correspond à la variation de temps entre deux battements cardiaques, ou deux pics R sur l'ECG, sur une période de temps donné. L'amplitude de la variabilité cardiaque est le témoin de notre capacité d'adaptation (plus cette amplitude est élevée, meilleure est la réponse physiologique d'adaptation, Figure 7).



**Figure 7:** Pattern de différentes variabilités de fréquence cardiaque (VFC)

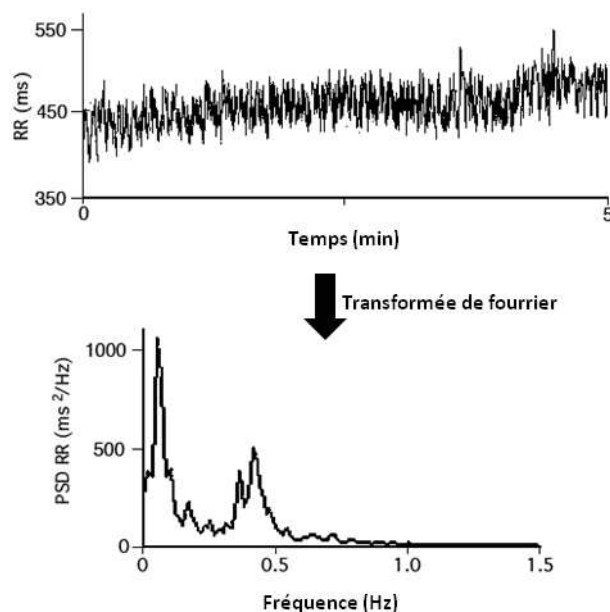
La VFC reflète donc la capacité à court terme du cœur à accélérer et à ralentir. L'activité intrinsèque du cœur par le tissu nodal est très stable lorsqu'il est isolé de l'organisme, aucune variabilité n'existe. La mesure de la VFC intègre donc les influences externes sur cette activité cardiaque basale à savoir l'influence SNA. En effet, le cœur est innervé au niveau du tissu nodal par le système nerveux sympathique et parasympathique. **L'influx parasympathique est très rapide (influence à très court terme) mais dure peu ; au contraire, l'influence sympathique est plus lente mais dure plus longtemps** (Shaffer et al. 2014). Ces influx sont opposés : l'influx sympathique est cardio-accélérateur tandis que le tonus parasympathique est cardio-modérateur. Au repos, l'activité cardio-modératrice

l'emporte sur l'activité cardio-accélétratrice (la FC du cœur au repos est inférieure à la FC du cœur isolé), mais cet équilibre sympathique/parasympathique est variable suivant de nombreux facteurs (externes ou internes). L'étude de la VFC rend compte des changements de l'intervalle RR, qui interviennent à très court terme ou à plus long terme. **Ainsi, la VFC est un bon indice de la balance sympathovagale sur l'activité cardiaque et peut être analysée par différentes méthodes.**

## 2) Méthodes d'analyse de la VFC

### *(i) Domaine fréquentiel*

L'analyse fréquentielle permet de décomposer le signal de la VFC en domaine de fréquence à partir d'une transformée de Fourier. L'analyse par transformée de Fourier est une méthode objective qui n'implique aucune perte d'information (Aubert et al. 2003), car il existe une relation directe entre le signal de départ et le spectre de fréquence obtenu après la transformation mathématique. La transformation de Fourier consiste à décomposer une fonction selon ses spectres de fréquences. Cette analyse spectrale permet de déceler les différentes fréquences d'oscillation d'un rythme, représentées sous la forme d'une densité spectrale en fonction de la fréquence. La puissance spectrale dans une bande de fréquence donnée peut être quantifiée en intégrant l'aire sous la courbe. Sa représentation graphique, présente en abscisse une échelle de fréquence, et en ordonnée, un nombre proportionnel à l'amplitude de l'oscillation ( $\text{ms}^2/\text{Hz}$ ) (Figure 8). A partir de ce spectre de fréquence, trois bandes de fréquences sont communément définies : VLF (very low frequency), LF (low frequency) et HF (high frequency). Chez l'homme, VLF est compris entre 0 et 0.04 Hz, LF entre 0.04-0.15 Hz et HF entre 0.15-0.4 Hz (Aubert et al. 2003).



**Figure 8:** Spectre de densité obtenu à partir de l'intervalle RR d'un ECG

**Les fluctuations de la bande VLF** ont une origine probablement multifactorielle (thermorégulation, système rénine angiotensine, système sympathique).

**Les fluctuations de la bande LF** pourraient être en relation avec les ondes de Mayer, mais l'interprétation en est controversée. L'onde de Mayer est de nature vasomotrice, donc sympathique, et certains auteurs relient donc ces oscillations à l'activité sympathique uniquement (Pagani et al. 1986). Néanmoins, pour certains auteurs, elles représenteraient un amalgame d'activités sympathique et parasympathique contrôlant le nœud sinusal (Pomeranz et al. 1985; Persson et al. 1992; Houle and Billman 1999). En effet, les oscillations présentes dans la bande LF sont partiellement abolies par l'atropine et les bêtabloquants. Il apparaît toutefois que la bande LF apparaisse augmentée par divers événements extérieurs comme le stress (mental ou physique) ou les états positionnels (debout/couché), et seraient notamment la conséquence d'une hyperactivité sympathique induite en partie par la réduction du baroréflexe (Robbe et al. 1987).

**Les fluctuations de la bande HF** sont sous influence de la respiration (et sont décrites comme l'arythmie sinusale respiratoire ou ASR) et traduisent les variations du tonus vagal exercé sur le nœud sinusal en réponse à la stimulation lors de l'inspiration des récepteurs intrapulmonaires sensibles à l'étirement (**réflexe de Bainbridge, voir chapitre I, paragraphe III**). Ces oscillations sont abolies par l'atropine. Ainsi, HF est considéré comme étant le reflet de l'activité parasympathique sur le cœur (Montano et al. 2009) par l'intermédiaire du nerf vague (Porges 1995).

**Le rapport LF/HF** est quant à lui un indice très utilisé pour évaluer la balance sympatho-vagale. Comme décrit ci-dessus, LF est sous influence mixte sympathique et parasympathique et HF uniquement parasympathique, donc le ratio LF/HF est souvent décrit comme un bon indice de l'activité sympathique. Mais les conclusions amenées par l'analyse de ce paramètre doivent être prises avec prudence, et doivent être corrélées avec l'analyse des bandes LF et HF elles-mêmes (Shaffer et al. 2014). En effet le ratio dépend bien sûr de chaque bande, et une augmentation du ratio qui ne dépendrait que de la baisse de HF, par exemple, n'indiquerait pas une augmentation de l'activité sympathique mais une réduction du tonus vagal uniquement.

### ***(ii) Domaine Temporel***

L'analyse dans le domaine temporel repose sur des paramètres statistiques assez simples mais ne renseigne pas sur la chronologie de ces valeurs ni sur leur nature périodique ou aléatoire.

Les variables dérivées directement de la mesure des intervalles RR :

- NN (normal to normal) : intervalle entre 2 battements cardiaques
- SDNN : déviation standard de l'intervalle RR sur toute la période d'enregistrement, standard deviation of all NN intervals) qui renseigne sur la variabilité globale. Elle corrèle avec la VFC totale.

Les variables dérivées de la différence entre les intervalles R-R :

- NN50 : nombre d'intervalles RR successifs différant de plus de 50 ms
- SDSD : déviation standard de la différence entre les intervalles RR successifs
- pNN50 : NN50 divisé par le nombre total d'intervalles, exprimant la variabilité de haute fréquence principalement d'origine parasympathique, modulée par la respiration
- RMSSD : moyenne quadratique des intervalles R-R successifs, exprimant la variabilité de haute fréquence d'origine parasympathique mais ne serait pas le reflet de l'influence respiratoire (Shaffer et al. 2014). Cette mesure est préférable à pNN50 et à NN50 d'après la Task Force (Task Force, 1996). Elle corrèle avec HF (Shaffer et al. 2014).

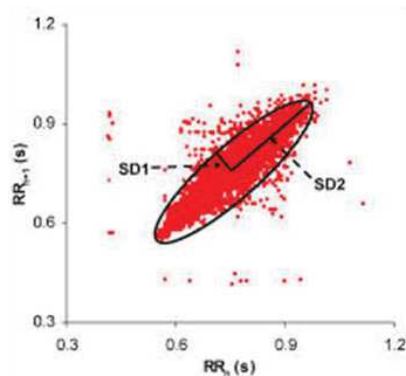
Comme il y a une corrélation entre SDNN et RMSSD, ces deux indices sont les mesures recommandées par la Task Force pour étudier la VFC. Ces deux indices temporels sont donc les plus utilisés dans les études portant sur la réponse cardiaque à la stimulation du système nerveux autonome.

### ***(iii)Analyse géométrique***

Des transformations mathématiques peuvent également être réalisées afin d'étudier les intervalles R-R sur 24h. C'est une approche alternative qui est basée sur l'analyse géométrique en créant l'indice triangulaire de la VFC (indice de St George) (Task Force, 1996 ; Malik and Camm 1990). Les intervalles NN sont comptabilisés par des histogrammes dont la base fait 7,8 ms. Un triangle est adapté à chaque histogramme par la méthode des moindres carrés. Deux mesures sont alors effectuées : la largeur du triangle en millisecondes, et l'indice triangulaire de la VFC qui est défini par le ratio du nombre total d'intervalles sur le nombre d'intervalles compté dans la tranche modale. Cet indice est fortement corrélé avec l'indice SDNN. Cette technique a l'avantage d'être moins sensible aux complexes ectopiques et aux erreurs de détection et donc de réduire la nécessité d'une édition précise (la classification des différents complexes QRS) de l'ECG ambulatoire.

### ***(iv)Analyse non-linaire : Poincaré***

La méthode consiste en l'application de techniques mathématiques complexes dérivées de la théorie du chaos. Cette théorie est habituellement employée pour analyser des phénomènes physiologiques très irréguliers mais qui ne sont pas aléatoires (Task Force, 1996). La construction des diagrammes de Poincaré représente une méthode simple consistant à tracer les points correspondant à chaque espace R-R d'un enregistrement Holter ECG de 24h, en fonction de son intervalle précédent sur un graphique. Ainsi, l'acquisition d'une figure, comparée à une comète ayant une grosse extrémité supérieure et une extrémité inférieure plus allongée peut être établie. A partir de ce graphe,  $SD1,2$  peut être calculé selon l'équation suivante ;  $SD1,2 = SD1/SD2$  (Figure 9, SD1 est le petit axe et SD2 le grand axe de l'éclipse). SD1 est l'indice de variabilité à court terme, reflet de l'activité parasympathique sur le nœud sinusal. SD2 est l'indice de variabilité à long terme et reflète à la fois l'activité sympathique et parasympathique sur le nœud sinusal. On peut également obtenir les indices  $SD1nu$  et  $SD2nu$ , qui correspondent aux indices SD1 et SD2 en unité normalisée, car ils prennent en compte l'évolution de la FC de repos (Tulppo et al. 1998).



**Figure 9:** Analyse de la variabilité de la fréquence cardiaque par la méthode de Poincaré

La VFC apporterait des indices fiables dans plusieurs champs du domaine médical tels que les réponses physiologiques liées aux émotions ou au stress. La VFC serait un bon prédicteur de risque cardio-vasculaire et de mortalité.

### 3) Etude de la VFC comme index de mortalité cardiovasculaire

Il est bien établi que l'analyse de la VFC est un facteur de risque cardiovasculaire. Les études portant sur des sujets présentant une hypertension ont montré une augmentation de la puissance des LF de la VFC comparés aux sujets normotendus (Fagard et al. 2007). La détection précoce de l'hypertension et l'étude de la VFC permettraient d'apporter des informations et de réduire les manifestations cliniques de l'hypertension (Siché et al. 1995).

De nombreuses études épidémiologiques réalisées sur la population générale ont mis en évidence une relation entre la diminution de la VFC et le risque accru d'insuffisance coronaire, de mortalité totale et de mortalité cardiaque (Tsuji et al. 1996; de Bruyne et al. 1999; Dekker et al. 2000; Lombardi et al. 1987; Bigger et al. 1993). Par exemple, l'augmentation du ratio LF/HF est un facteur de risque de survenue des arythmies ventriculaires (Lanza et al. 1997). Le facteur rMSSD est diminué chez les patients ayant une pathologie coronarienne (La Rovere et al. 2001). L'étude MPIP (Multicentre Post Infarction Program) (Kleiger et al. 1987) a été réalisée chez environ 800 patients ayant présenté un infarctus du myocarde (IDM) récent. Ce travail a montré que les patients ayant un SDNN inférieur à 50 ms avaient un risque de mortalité 5 fois plus élevé que ceux ayant un SDNN plus élevé, supérieure à 100 ms. Ces résultats sont confirmés par une autre étude qui a utilisé l'analyse fréquentielle de la VFC (Bigger et al. 1992).

Dans le cadre de l'étude ATRAMI (Autonomic Tone and Reflex after myocardial infarction), une analyse rétrospective a été effectuée (La Rovere et al. 1998). Cette étude a porté sur 1284 patients ayant présenté un infarctus du myocarde aigu et un SDNN inférieure à 70 ms a été présenté comme un facteur prédictif de mortalité cardiovasculaire.

Cela s'accompagne d'une diminution du taux de survie. Dans une étude menée chez des sujets atteints d'une insuffisance cardiaque et suivis pendant environ 50 mois, le SDNN était un facteur pronostic avec 80 % de survie à 50 mois pour les patients ayant un SDNN > 100 ms contre seulement 40 % quand celui-ci était inférieur à 100 ms (Fauchier et al. 1997).

## **II) Physiologie du système respiratoire**

### **A) Notions générales**

L'échange gazeux entre l'environnement et l'organisme se fait au niveau des sacs alvéolaires des poumons. L'air extérieur est acheminé jusqu'aux poumons via les voies aériennes supérieures et inférieures permettent de conduire l'air jusqu'aux poumons. Les voies aériennes supérieures comprennent le nez, le pharynx et le larynx. Les voies aériennes inférieures sont constituées de la trachée, des bronches, des bronchioles et des sacs alvéolaires. Ces derniers sont le lieu de transfert des gaz vers le sang. Autour de chaque sac alvéolaire, un réseau de capillaires permet des échanges gazeux entre l'air et le sang.

L'entrée et la sortie d'air dans les poumons se fait grâce à l'action de muscles respiratoires. Les muscles assurant l'inspiration sont le diaphragme, les intercostaux externes, les sterno-cléido-mastoïdiens, les scalènes et le parasternal. Le diaphragme est le principal muscle utilisé lors de la respiration. Sa contraction entraîne une augmentation du volume de la cavité thoracique en tirant les poumons vers le bas, c'est l'inspiration.

L'expiration est un phénomène passif, les muscles intercostaux et le diaphragme se relâchent. Les muscles expiratoires n'interviennent qu'en cas d'expiration forcée et sont les intercostaux internes, les abdominaux (obliques externes et internes, transverses et grand droit).



## **B) Commande centrale respiratoire**

Les mouvements respiratoires sont automatiques et cycliques, ils dépendent de l'activité des centres respiratoires bulbaires. Ils envoient à intervalles réguliers des incitations motrices aux nerfs des muscles inspiratoires.

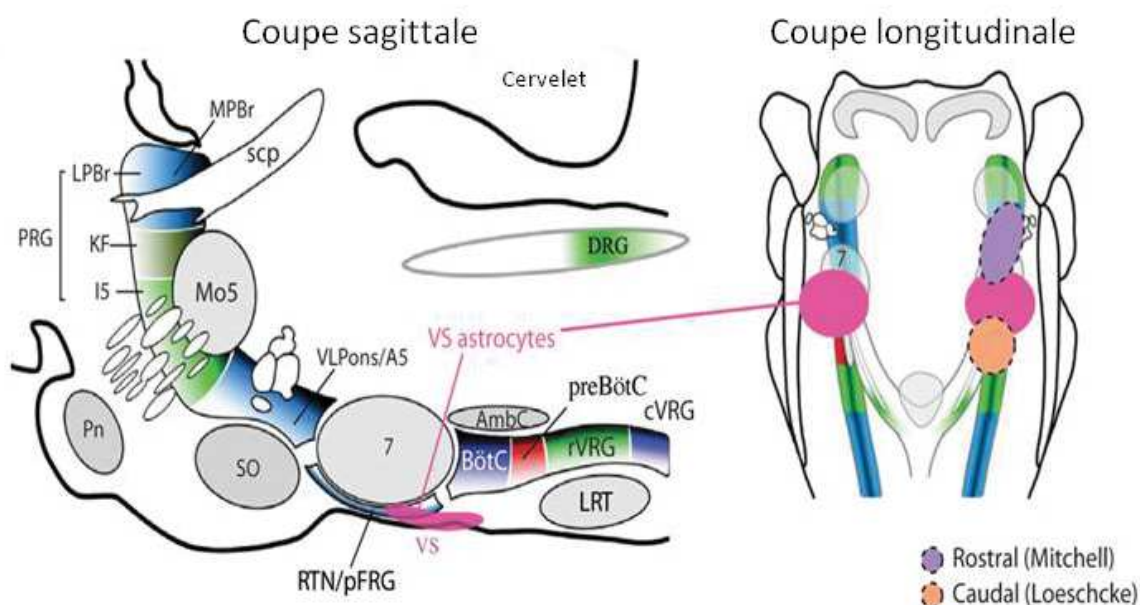
Les centres respiratoires ont été principalement décrits à partir d'études chez le rat et le chat. Il s'agit d'un réseau neuronal complexe où de nombreuses interactions synaptiques entre plusieurs groupes de neurones prémoteurs respiratoires élaborent les trois phases du rythme respiratoire (inspiration, post-inspiration et expiration, (Bianchi et al, 1995) et mettent en forme le patron moteur (ou pattern ou motif) distribué aux motoneurones crâniens et spinaux pilotant l'appareil respiratoire.

Les centres respiratoires sont situés dans le tronc cérébral et comprennent le groupe respiratoire ventral (GRV) localisé dans la réticulée bulbaire ventrolatérale, et le groupe respiratoire dorsal (GRD) situé dans la division ventrolatérale du NTS (Figure 10). Ces cellules sont en relation avec les noyaux moteurs des nerfs phréniques et thoraciques (Bianchi et al, 1995). La génération du rythme respiratoire est toujours débattue et une revue récente (Feldman and Del Negro 2006; Janczewski and Feldman 2006) argumente la présence de 2 générateurs distincts au sein du GRV (Figure 10): le complexe de Pré-Bötzinger (pré-BötC) et le groupe de noyaux rétrotrapezoidien et parafacial (RTN/pFRG). Les deux groupes ayant montrés la propriété de décharger de façon rythmique et autonome, le premier (pré-BötC) synchronisé avec les bursts inspiratoires du diaphragme génèrerait l'inspiration active et une expiration passive. Le second (RTN/pFRG) déchargeant en décalage par rapport à la phase inspiratoire du pré-BötC génèrerait l'expiration active et une inspiration passive. Les deux générateurs seraient fonctionnellement couplés, mais seule la région du pré-BötC serait sensible aux opioïdes.

Il existe également des centres respiratoires pontiques :

- Chez l'animal vagotomisé, l'ablation d'un groupe neuronal pontique comprenant les noyaux parabrachial médian et Kolliker-Füse entraîne une respiration apneustique formée d'inspirations très longues (Cohen and Wang 1959; Bertrand and Hugelin 1971; Feldman and Gautier 1976; Von Euler et al. 1976). Cette structure, nommée groupe respiratoire pontique ou PRG (Feldman, 1986) comporte des neurones qui déchargent de façon tonique avec une fréquence correspondant aux phases respiratoires. On retrouve donc des neurones inspiratoires, expiratoires ou transitionnels, c'est-à-dire actifs entre les deux phases respiratoires (Bertrand and Hugelin 1971). Le PRG reçoit des afférences du NTS et de régions

ventrales du bulbe qui sont en relation avec les fonctions viscérales, cardiovasculaires, gustatives et neuroendocrines (G. Song et al. 2011). Les neurones du PRG entretiennent aussi des connexions réciproques avec les centres générateurs (RTN/pFRG et PreBotZ) (Bochorishvili et al. 2012). L'ensemble des données fonctionnelles suggère que le PRG influence la terminaison de l'inspiration et la durée des différentes phases du cycle respiratoire. Il existe aussi un autre mécanisme de contrôle du rythme respiratoire en provenance du pont latéral et ventrolatéral, et plus particulièrement des neurones noradrénergiques du groupe A5. Les neurones A5 exercent une modulation négative de la genèse du rythme dans une préparation de tronc cérébral isolé (Hilaire et al. 1989; Errchidi et al. 1991). Des stimulations électriques de ces neurones entraînent une diminution de la fréquence respiratoire et deviennent inefficaces en présence d'antagonistes noradrénergiques (Hilaire et al. 1989). Réciproquement, l'élimination du pont entraîne une augmentation de la fréquence respiratoire (Errchidi et al. 1991).



**Figure 10: Anatomie des structures bulbaires impliquées dans le contrôle de la respiration (Adapté de Seta et al. 2002)**

DRG, Groupe respiratoire dorsal ; r/cVRG, groupe respiratoire ventral rostral ou caudal ; preBötC, complexe de pré-Bötzinger ; BötC, complexe de Bötzingen ; 7, noyau facial ; A5, neurones noradrénergiques A5 ; AmbC, Noyau ambigu ; LRT, noyau réticulaire latéral ; Mo5, noyau moteur

trigéminal; Pn, noyau pontique basilaire; RTN/pFRG, noyau rétrotrapézoïde et groupe respiratoire parafacial ; scp, pédoncule cérébrale supérieur; SO, olive supérieure; and VLPons, pons ventrolatérale.

Les centres respiratoires bulbaires intègrent de nombreuses informations périphériques et centrales, ce qui permet de moduler et d'adapter la respiration à l'environnement.

### C) Modulations centrales et périphériques

Les neurones bulbaires du GRV sont modulées indirectement par des informations en provenance de la périphérie, et notamment celles issues des mécanorécepteurs (e.g. récepteurs d'étirement pulmonaire) mais aussi des chémorécepteurs carotidiens (et aortiques pour une petite part). Les chémorécepteurs carotidiens sont localisés dans des glomus situés au niveau de la bifurcation carotidienne, et détectent principalement les variations de PA en O<sub>2</sub> (PaO<sub>2</sub>), mais aussi dans une moindre mesure en CO<sub>2</sub> (PaCO<sub>2</sub>) et du pH artériel. **En particulier, la stimulation des chémorécepteurs carotidiens par une hypoxie (diminution de la PaO<sub>2</sub>) gazeuse (baisse de la fraction en O<sub>2</sub> dans l'air inspiré) ou cytotoxique (cyanure de potassium) entraîne en premier lieu une augmentation de l'activité ventilatoire accompagné d'une augmentation du volume courant, ou hyperventilation** (suivi par une baisse ventilatoire dans le cas de l'hypoxie gazeuse). C'est au niveau du NTS que se projettent les afférences dopaminergiques glossopharyngiennes en provenance des chémorécepteurs périphériques (Davies and Edwards 1973; Jordan and Spyer 1977; Lipski et al. 1977). Ces informations sont ensuite transmises au GRV afin d'ajuster la commande motrice respiratoire (Roda et al. 2002; Kubin et al. 2006). Par conséquent, ceci explique que l'activation des chémorécepteurs périphériques par une hypoxie induit une hyperventilation dans le but de corriger le bas niveau en pO<sub>2</sub> dans le sang et le RTN peut être perçu comme un relais des chémorécepteurs périphériques vers les muscles respiratoires effecteurs. De plus, à partir du NTS, de nombreuses projections se dirigent vers les centres générateurs et le noyau Kolliker-Fuse (Otake et al. 1989).

Les différentes populations de neurones respiratoires bulbaires du GRV sont aussi influencées par l'activation des chémorécepteurs centraux sensibles aux augmentations de pression partielle en CO<sub>2</sub> et de baisse de pH (**hypercapnie**) (Waldrop 1991; Peano et al. 1992; Horn and Waldrop 1994). La réponse ventilatoire induite par l'hypercapnie est une augmentation du volume courant et de la fréquence respiratoire, et l'une des régions clé impliquées dans les

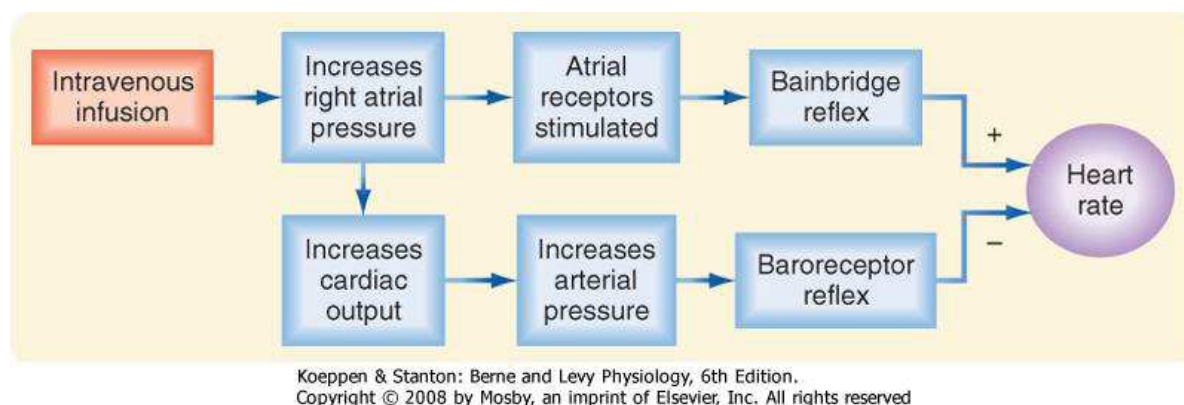
réponses ventilatoires à l'hypercapnie est **l'hypothalamus caudal**. En effet, *i)* l'ablation du diencéphale est suivie d'une diminution de l'hyperventilation hypercapnique (Fink et al. 1962; Nielsen et al. 1986), *ii)* l'hypothalamus caudal contient des neurones type orexinergique stimulés directement par une augmentation de la PCO<sub>2</sub> et/ou des ions H<sup>+</sup> (Dillon and Waldrop 1992; Horn and Waldrop 1998), dont l'inhibition induit une diminution importante de l'hyperventilation induite par l'acidification de cette région encéphalique (Song et al. 2012; Deng et al. 2007; Nakamura et al. 2007; Li and Nattie 2010). **Il est important de noter que ces neurones envoient des projections vers la région RTN/pFRG** (Lazarenko et al. 2011), qui contient des cellules présentant à leur membrane le récepteur de type 1 à l'orexine (Dias et al. 2009), et que les neurones orexinergiques de l'hypothalamus innervent aussi la région pré-BötC et modulent l'activité des neurones inspiratoires de cette région (Young et al. 2005; Dreshaj et al. 2003; Kc et al. 2002).

**En plus de cela, les neurones du RTN/pFRG sont également intrinsèquement chémosensibles au proton et réagissent donc lorsque l'organisme se trouve en hypercapnie** (Bianchi et al. 1988; Feldman and Del Negro 2006; Feldman and Janczewski 2006; McCrimmon et al. 2004; Ezure 1990). L'implication du groupe RTN/pFRG dans le chémoréflexe central a été observé à partir d'expériences immunohistochimiques qui ont montré que Fos était surexprimé dans les neurones du RTN/pFRG suite à une hypoxie (Larnicol et al. 1994) ou à une hypercapnie (Teppema et al. 1994). Ainsi, les neurones du RTN/pFRG modulent une grande partie de la réponse ventilatoire à l'hypercapnie (Guyenet et al. 2005; Gestreau et al. 2010; Guyenet et al. 2010; Huckstepp and Dale 2011; Ramanantsoa et al. 2011; S. Wang et al. 2013).

**La région RTN/pFRG a donc un rôle clé dans le chémoréflexe aussi bien en condition d'hypoxie (chémoréflexe périphérique et central) qu'en hypercapnie (chémoréflexe central).**

### III) Interaction des systèmes cardiovasculaires et respiratoires : étude par la VFC

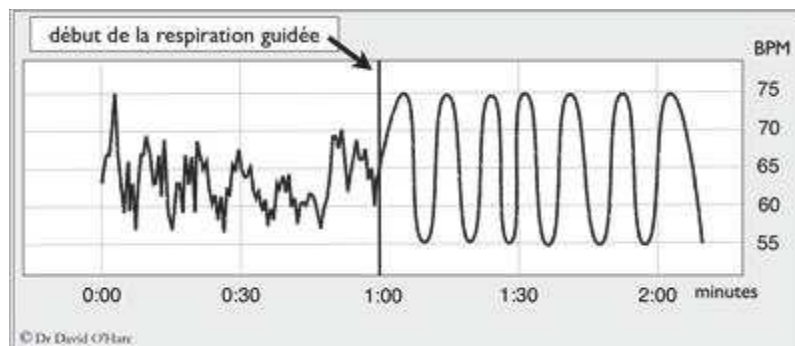
Comme nous l'avons indiqué brièvement dans le chapitre I paragraphe I)C)2), la mesure de la VFC au repos permet d'avoir un reflet de l'équilibre entre système nerveux sympathique et système nerveux parasympathique, **notamment lors du cycle respiratoire par l'induction du réflexe de Bainbridge**. Lorsque la PA augmente, ceci augmente la pression au niveau de l'oreillette droite, et des récepteurs sensibles à l'étirement localisés à la jonction de l'oreillette droite et de la veine cave vont alors être activés et produire deux actions : d'une part, les récepteurs au niveau du nœud sinusal vont agir localement et faciliter la transmission sympathique, et surtout d'autre part des fibres neuronales remontant dans le nerf vague vers le NTS vont agir au niveau du noyau ambigu pour réduire le tonus parasympathique et donc freiner le ralentissement cardiaque (Hakumäki 1987). Ces deux mécanismes vont contribuer à augmenter la FC. Il est à noter que l'augmentation de la pression au niveau de l'oreillette induit une augmentation du débit cardiaque et donc de la PA : donc le cœur devrait être ralenti par l'induction du baroréflexe, mais ce phénomène est compensé par le réflexe de Bainbridge (Figure 11).



**Figure 11 : réflexe de Bainbridge**

Lors de l'expiration, la pression atriale diminue et le réflexe de Bainbridge s'arrête, il y a alors facilitation du baroréflexe. Ces oscillations rythmiques induites par la respiration représentent comme nous l'avons dit précédemment l'ASR. On parle de « **cohérence cardiaque** » quand on atteint un état d'équilibre sympathovagal idéal, induit par un temps idéal entre chaque inspiration et expiration (Bernardi et al. 2001 ; Dick et al. 2014). Il est obtenu

chez l'homme lorsque la respiration est descendue volontairement à 0.1 Hz, permettant un temps idéal de repos entre chaque inspiration. Alors la VFC présente un aspect sinusoïdal tout à fait caractéristique (Figure 12).



**Figure 12 :** Variabilité de la fréquence cardiaque au repos et lors de la cohérence cardiaque

Ce rythme respiratoire à 0.1 Hz augmente la sensibilité du baroréflexe chez des personnes saines (Radaelli et al. 2004), réduit l'hyperactivité sympathique des patients souffrant de pathologies respiratoires telles que la Broncho Pneumopathie Obstructive Chronique (BPCO) (Raupach et al. 2008), et montre des résultats concluant pour traiter l'hypertension de façon non pharmacologique (Joseph et al. 2005; Sharma et al. 2011). Ces observations représentent donc des arguments de poids en faveur d'une interrelation entre la respiration, le système nerveux autonome et le système cardiovasculaire.

## **CHAPITRE II : LE STRESS**

### **I) Notions générales**

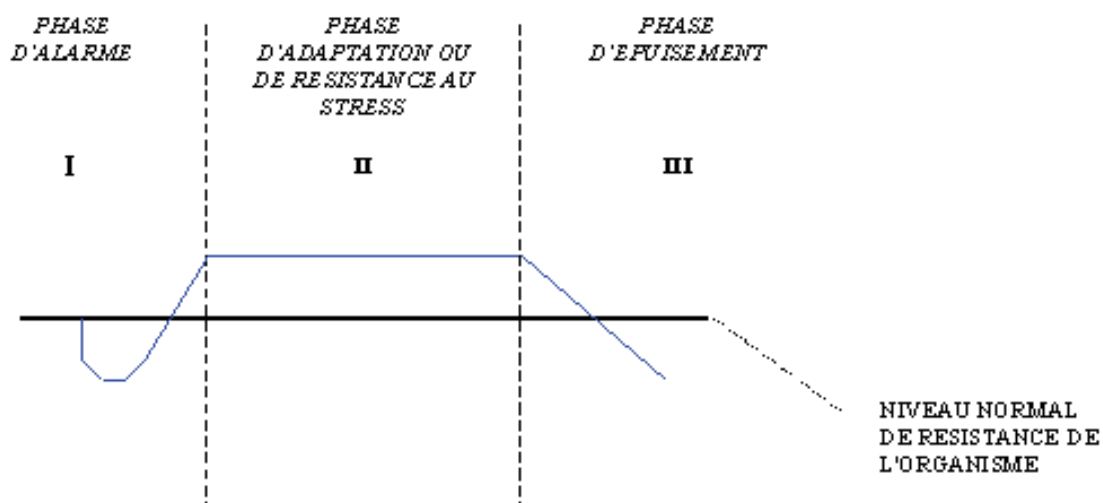
Le mot stress vient du latin *stringere* qui veut dire tendu, raide et de l'anglais *distress* qui veut dire détresse. A ses débuts, le concept de stress est limité à l'idée d'une suite de réactions biologiques, puis il évolue avec les nombreuses théories scientifiques qui ont tenté de le développer, pour devenir actuellement une notion plus large, interactive entre l'individu et son environnement (Boudarene et al. 1997; Agarwal 1994).

En 1872, Darwin considère que la peur avec toutes ses manifestations avait pour rôle de préparer l'organisme à faire face au danger. Au 19<sup>e</sup> siècle, Claude Bernard introduit la notion d'équilibre entre le milieu extérieur et intérieur. Selon lui toutes les réactions du sujet face au stress n'ont qu'un seul but, celui du maintien de l'équilibre du milieu intérieur (Laborit 1988). Ensuite, le mot stress réapparaît au 20<sup>e</sup> siècle dans le langage des physiologistes. En 1914, W. Cannon, utilisant la notion de stress dans un sens physiologique, puis en 1928 dans un sens psychologique, conçoit le stress comme « correspondant à des stimuli aussi bien physiques qu'émotionnels (Routier 1991). Il précise les idées de Claude Bernard en développant la notion de constance du milieu intérieur ou homéostasie (Laborit 1988) et définit la notion d'homéostasie comme une fonction fondamentale assurée par un ensemble de processus dynamiques visant au maintien du milieu intérieur.

Cannon indique la non-spécificité de la réponse sympathique en fonction du stimulus précisant que la mise en jeu du système sympathique a pour but de préparer l'animal à l'action. La réponse aux situations de danger se fait par le biais d'une sécrétion quasi réflexe et instantanée qui prépare l'animal à la lutte ou à la fuite (fight or flight) (Boudarene et al. 1997). Dans cette optique, les réactions de défense visent à mobiliser les ressources énergétiques de l'organisme pour une dépense supplémentaire d'énergie. Ensuite dans les années trente, Dr Hans Selye, endocrinologue, introduit lui aussi le concept de stress en individualisant les réactions physiologiques communes à toutes les agressions. Il définit le stress comme étant un ensemble de réponses non spécifiques de l'organisme pour faire face à des situations d'agression. L'ensemble de ces réponses est appelé syndrome général d'adaptation (**SGA**) qui évolue en 3 phases dans le temps (Figure 13): la phase d'alarme ou d'alerte, la phase de résistance ou d'adaptation et la phase d'épuisement. Selon cette définition le stress est un état qui se manifeste par un syndrome spécifique, englobant tous les



changements aspécifiques qui interviennent dans le système biologique. Le stress constitue dans un **premier temps**, l'agent causal, le plus souvent représenté par des agents extérieurs nocifs. Dans un **deuxième temps**, le stress n'est plus l'agent causal mais la réponse de l'organisme à cet agent. Ainsi Hans Selye considère le stress comme étant tout à la fois l'agent et le résultat de son action. Il faut rappeler que dans l'élaboration de ce concept, Selye faisait déjà la distinction essentielle entre eustress (bon stress) et distress (mauvais stress). Le concept de stress a donc évolué et changé de signification au cours des années, de causes déclenchantes de Cannon, il devient effet consécutif avec Selye (Selye 1936, 1950). Ensuite on a assisté à un élargissement progressif du concept et de son champ d'application.



**Figure 13 : Les différentes phases du syndrome général d'adaptation (SGA)**

Les travaux de recherche se sont multipliés et ont suivi schématiquement deux axes de recherche. Le premier s'est focalisé sur les aspects neurobiologiques du stress et le second sur les dimensions psychologiques selon trois approches : psychosociale, cognitive, et psychobiologique (Boudarene et al. 1997). Les études neurobiologiques ont permis de préciser la nature et le rôle des systèmes hormonaux et neuronaux qui sont impliqués dans la mise en œuvre et régulation du stress. Les travaux psychologiques se sont intéressés, eux, aux aspects relationnels entre la réaction et l'agression. Ainsi, le concept du stress s'est élargi aux agressions psychologiques et sociales.

La réaction du stress n'est donc plus considérée comme une simple réponse limitée dans le temps mais devient une **réponse adaptative, dynamique** et qui est à la fois **biologique et comportementale** par la mise en jeu de l'axe hypothalamo–hypophyso–corticosurrénalien appelé **axe corticotrope ou axe HHS**.



## **II) Bases physiologiques du stress**

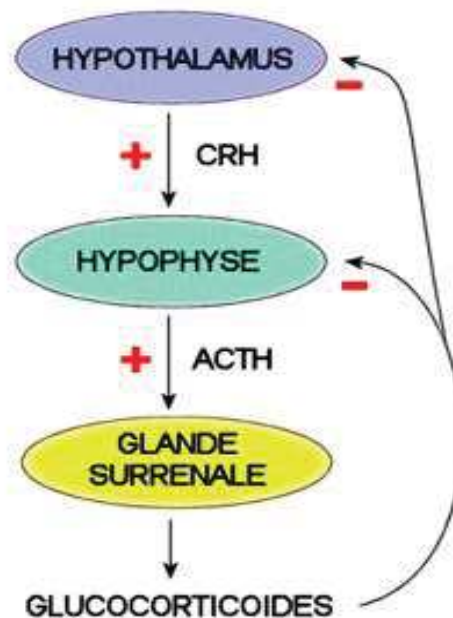
### **A) Le système limbique**

Il comprend la région septale, le fornix, l'hippocampe, le complexe amygdalien et les cortex insulaire et fronto-orbitaire postérieur. Il contrôle le comportement, les émotions, la motivation. Il intervient également dans la régulation de conditions internes de l'organisme tel que la température corporelle, la sensation de faim et de soif, l'équilibre osmotique. C'est une zone de perception des stimuli externes qui joue un rôle dans le déclenchement des réactions en stimulant l'hypothalamus auquel il est lié par un ensemble de neurones.

### **B) L'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien ou axe HHS**

#### **1) L'hypothalamus**

Il reçoit des projections nerveuses provenant du système limbique (hippocampe et amygdale, du thalamus...), des noyaux monoaminergiques du bulbe, du tronc cérébral et du faisceau optique accessoire de la rétine. C'est un relais clé dans l'intégration des afférences émotionnelles et dans la réponse émotionnelle. Il est classiquement admis que les neurones hypothalamiques dans la portion parvocellulaire du noyau paraventriculaire (PVN) produisent la corticolibérine ou corticoreleasing hormone (CRH), qui va agir sur l'hypophyse (Figure 14).



**Figure 14: Axe du stress**

## **2) L'hypophyse**

Glande endocrine de petite taille, l'hypophyse est située à la base du crâne dans une loge appelée "selle turcique", en rapport anatomique direct avec le chiasma optique. Elle est attachée au cerveau (diencéphale) par la tige pituitaire. On distingue trois zones, ou lobes, dans l'hypophyse : l'antéhypophyse (adénohypophyse) située rostralement ; la post-hypophyse (neuro-hypophyse) située caudalement et le lobe intermédiaire. L'influence de la CRH stimule l'antéhypophyse pour que celle-ci sécrète l'hormone corticotrope (ACTH, Adreno Cortico Tropic Hormone), qui elle-même stimule le cortex surrénal. Une augmentation du taux d'ACTH est classiquement associée à une suractivation de l'axe HHS (Gadek-Michalska et al. 2015).

## **3) Les glandes surrénales**

Situées chacune aux pôles supérieurs des 2 reins, les surrénales sont formées de deux glandes endocrines associées anatomiquement mais embryologiquement et fonctionnellement différentes :

- la corticosurrénale qui sécrète les glucocorticoïdes (cortisol chez l'homme et corticostérone chez les volailles et le rongeur), et les minéralocorticoïdes (aldostérone).
- médullosurrénale constituée de cellules nerveuses dites « chromafines » qui ont migré à partir des cellules de la crête neurale et qui sécrètent les catécholamines (adrénaline et noradrénaline).

L'influence du stress et donc de l'ACTH va activer les glandes corticosurrénales afin de synthétiser les corticoïdes intervenant de façon importante dans le SGA (Chrousos and Gold 1992; Dantzer 1995). Une augmentation du taux de cortisol est classiquement associée à une suractivation de l'axe HHS (Lopez-Duran et al. 2015).

#### **4) Les récepteurs aux corticostéroïdes**

Les corticostéroïdes agissent par l'intermédiaire des récepteurs intracellulaires (Bamberger et al. 1996): récepteurs aux minéralocorticoïdes (MR) et récepteurs aux glucocorticoïdes (GR).

Au niveau même des glandes surrénales, les glucocorticoïdes régulent directement la stéroïdogénèse (Carsia and Malamed 1983) en inhibant l'expression des enzymes impliquées. De nombreux facteurs et conditions peuvent déterminer la sensibilité tissulaire aux corticostéroïdes (Bamberger et al. 1996). Il s'agit de la disponibilité extracellulaire et intracellulaire des hormones, des niveaux d'expression des récepteurs aux glucocorticoïdes et des affinités de liaison. En effet une augmentation du feedback négatif par les glucocorticoïdes induit une hypocortisolémie sur les 24h.

**Dans le cerveau les MR sont majoritairement présents au niveau de l'hippocampe, mais aussi de l'amygdale tandis que les GR sont ubiquitaires avec une forte concentration dans l'hippocampe et dans l'hypothalamus** (Wetzler et al. 2005; Dallman et al. 1994; Schmidt and Meyer 1994 ; De Kloet et al. 1998). La corticostérone, principal corticostéroïde chez le rat, se lie avec une grande affinité aux MR et avec 10 fois moins d'affinité aux GR (Nishi and Kawata 2000; Funder 2005). Compte tenu de ces affinités, les glucocorticoïdes se lient préférentiellement aux MR en situation basale (faible concentration) (Deuschle et al. 1998; Young et al. 1998) alors que la saturation des GR n'a lieu qu'en situation d'hypersécrétion comme après un stress, pendant la phase active du rythme circadien ou en situation pathologique d'hypercorticisme (Boyle et al. 2006; Dallman et al. 1994). D'autres fonctions physiologiques comme les états comportementaux sont influencées par les MR et GR dans le cerveau (Herrero et al. 2006). Les corticostéroïdes modulent les processus périphériques, tel que le métabolisme du glucose à travers les GR (Tempel and Leibowitz 1994), ou l'équilibre minéral et hydrique via les MR (McEwen et al. 1986).

**Les glucocorticoïdes agissent sur de nombreux organes mais aussi sur des structures cérébrales afin de réguler leur propre sécrétion : c'est le rétrocontrôle négatif.** En effet, les glucocorticoïdes exercent un rétrocontrôle négatif sur plusieurs structures cérébrales de l'axe HHS et limitent ainsi la durée d'exposition de l'organisme à ces stéroïdes, afin d'en minimiser les effets délétères (effets cataboliques, et immunodépresseurs). Trois structures se distinguent nettement comme étant les acteurs clé du rétrocontrôle négatif des glucocorticoïdes sur l'axe corticotrope : **l'hypothalamus, l'hypophyse et les glandes surrénales.** Des structures extra-hypothalamiques (l'hippocampe) interviennent aussi dans ce rétrocontrôle négatif. L'activité de l'axe corticotrope varie au cours du rythme circadien ; ainsi, l'intensité du rétrocontrôle négatif exercé par les glucocorticoïdes est accrue au moment de la phase active du cycle nycthéral (Suemaru et al. 1995; Follenius et al. 1982). L'intensité de rétrocontrôle sur les structures cérébrales tel que l'hippocampe est plus élevée en situation de stress aigu qu'en situation de stress chronique (Herman et al. 1999; Sapolsky and Eichenbaum 1980; Cooney and Dinan 2000). Ce rétrocontrôle (ou "test de suppression") est classiquement étudié par l'étude de l'effet de l'administration de doses fortes de dexaméthasone (corticostéroïde similaire à ceux produits naturellement par les glandes surrénales, et qui se lie donc aux récepteurs GR) sur la production d'ACTH et de cortisol (qui doivent donc être réduites) lors de l'application d'un stress (Cole et al. 2000).

Cependant, à partir d'un certain seuil, l'excès de glucocorticoïdes induit des effets délétères: en effet, des taux trop importants induisent une désensibilisation des GR dans plusieurs structures de l'axe HHS (Raison and Miller 2003) et un déficit de la prolifération cellulaire associé à une atrophie dendritique au niveau de l'hippocampe (Clark et al. 1995). Il existe alors une hyperactivation de l'axe HHS, comme lors d'état pathologiques tels que les troubles anxiodépresseurs. Le test de suppression à la dexaméthasone apparaît par exemple inefficace chez les patients sujets aux troubles liés au stress, car les récepteurs GR sont alors inefficaces (Rush et al. 1996).

### **III) Pathologies liées au stress : troubles anxiodépressifs**

#### **A) Généralités**

La chronicité d'un stress ou l'accumulation d'évènements traumatiques induisent des modifications psychiques importantes menant à des troubles émotionnels tels que le repli sur soi, l'agressivité et/ou des envies suicidaires, qui caractérisent notamment les troubles anxiodépressifs. Le diagnostic d'un état dépressif ou anxieux est établi uniquement sur la base des échanges verbaux intervenant entre le patient et son psychiatre ; il se fonde sur des classifications psychiatriques internationales qui catégorisent les pathologies psychiatriques, telles que le Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM). Le DSM qui constitue un manuel de référence pour le diagnostic des troubles mentaux. Il évolue de façon permanente et est particulièrement utilisé pour les recherches statistiques et le diagnostic des troubles psychiatriques. Il est édité par l'Association Américaine de Psychiatrie (American Psychiatric Association, APA). La version actuellement utilisée est DSM-5, éditée en 2013. Ce manuel reconnaît 410 troubles psychiatriques. Les maladies présentant une pathologie psychiatrique ou neuropsychiatrique sont identifiées avec un nombre minimum de critères communs.

#### **B) Troubles dépressifs**

##### **1) Généralités**

La prévalence de l'épisode dépressif caractérisé au cours des douze derniers mois telle que mesurée dans le cadre du Baromètre Santé de l'INPES s'élevait en France, au début des années 2000, à 7,5 % parmi les 15-85 ans (Chan Chee et al. 2011). Cette prévalence est environ deux fois plus importante chez les femmes que chez les hommes. Elle est de 6,4 % parmi les 15-19 ans, 10,1 % parmi les 20-34 ans, 9,0 % parmi les 35-54 ans et 4,4 % entre 55 et 85 ans. La dépression est une maladie complexe aux symptômes multiples, qui peut par exemple être induite par un dysfonctionnement du rythme circadien (Duffy et al. 2015) ou à la suite de certaines pathologies comme des fibromyalgies (Chang et al. 2015). Le diagnostic d'une dépression est établi uniquement sur la base des échanges verbaux intervenant entre le patient et son psychiatre, aucun marqueur biologique fiable et spécifique (autre que celui de stress) de la pathologie dépressive n'étant actuellement disponible.

Selon le DSM-5, les troubles dépressifs peuvent se présenter sous trois formes :

1°) Le trouble dépressif majeur, qui se caractérise par un ou plusieurs épisodes dépressifs majeurs. Selon les critères établis par le DSM-5, un épisode dépressif majeur est diagnostiqué

lorsque le sujet présente pendant une période d'au moins deux semaines une humeur dépressive quasi quotidienne et/ou une perte d'intérêt ou de plaisir (anhédonie) dans les activités quotidiennes. Il est avéré si, durant cette période, apparaissent au moins quatre des symptômes suivants :

- Modification significative du poids (> 5 % en un mois) ou de l'appétit
- Perturbation quotidienne du sommeil (insomnie ou hypersomnie)
- Agitation ou un ralentissement psychomoteur quasi-quotidien
- Fatigue ou perte d'énergie quasi quotidienne
- Sentiments d'inutilité ou de culpabilité excessifs ou inappropriés quasi quotidiens
- Diminution de la capacité à penser, à se concentrer, à décider quasi quotidienne
- Pensées récurrentes de mort, de suicide, de tentative de suicide

2°) Le trouble dysthymique qui se réfère à un état dépressif plus léger, c'est-à-dire défini par la présence d'une humeur dépressive la plupart du temps pendant au moins deux ans, associée à des symptômes dépressifs qui ne remplissent pas les critères de l'épisode dépressif majeur.

3°) Les troubles dépressifs non-spécifiés qui désignent les troubles dont les symptômes dépressifs ne répondent pas aux critères de trouble dépressif majeur.

Ces symptômes ne sont pas imputables aux effets directs d'une substance (drogue ou médicament) ou à une affection médicale générale. Ils ne sont par ailleurs pas en relation avec un deuil, sauf s'ils persistent plus de deux mois après la perte d'un être cher et sont associés à un sentiment morbide de dévalorisation, à des pensées suicidaires, à des symptômes psychotiques ou à un ralentissement psychomoteur.

D'autres complications peuvent être observées lors d'un épisode dépressif mais non répertoriées dans le DSM-5, notamment au niveau somatique avec des altérations du comportement sexuel (baisse de libido, impuissance, frigidité), des troubles digestifs (diarrhée ou constipation, gastralgie) ou encore des troubles cardio-vasculaires (palpitations, bouffées vasomotrices, hypertension, tachycardie). De plus, cet épisode est associé à des difficultés cognitives incluant des déficits de concentration, d'attention et de mémoire (Pittenger and Duman 2007; Zakzanis, Leach, and Kaplan 1998). Les patients dépressifs ont la particularité d'avoir une hypoactivité de l'hippocampe accompagnée d'une diminution du volume de cette structure (Videbech and Ravnkilde 2004; McKinnon et al. 2009).

## 2) Pharmacothérapie

Plusieurs traitements sont à l'heure actuelle utilisés. La plupart d'entre eux vise le système monoaminergique. Les premiers traitements ont été élaborés dans les années 50 suite à des découvertes fortuites. L'imipramine constitue le premier antidépresseur tricyclique synthétisé qui agit, entre autres, en inhibant la recapture de la sérotonine et de la noradrénaline. Bien que leurs cibles soient différentes, le mécanisme d'action de ces deux molécules vise à accroître la quantité des monoamines dans la fente synaptique (Leonard 1997; Svensson 2000), menant à la formulation de l'hypothèse monoaminergique dans la dépression. Selon cette hypothèse, la dépression résulterait d'une réduction de la disponibilité en monoamines (5-HT, noradrénaline et dopamine). Ainsi, de nombreux médicaments se sont développés à partir de cette hypothèse et constituent les traitements antidépresseurs majeurs prescrits aujourd'hui. Cependant, leur efficacité est souvent limitée car environ 30 % des patients ne répondent pas à ce type de traitement (Fava 2003). D'autre part, leur administration induit des effets secondaires indésirables importants (Nestler et al. 2002).

### *Les Inhibiteurs de la monoamine oxydase (IMAO)*

Il existe deux isophormes de monoamine oxydase (MAO), la MAO de type A (MAOA), préférentiellement exprimée dans les neurones catécholaminergiques et la MAO de type B (MAOB) synthétisée de manière majoritaire dans les neurones sérotoninergiques et dans les astrocytes. Elles dégradent par oxydation la sérotonine, la dopamine, la noradrénaline, et l'adrénaline (Youdim et al. 2006). Les inhibiteurs de ces enzymes (IMAO) conduisent donc à une augmentation de monoamines dans la fente synaptique. Les IMAO utilisés comme antidépresseurs regroupent des composés tels que l'iproniazide, la moclobémide ou encore la phénelzine, qui sont essentiellement des IMAOA ou des IMAO non sélectifs.

### *Les antidépresseurs tricycliques*

Les antidépresseurs tricycliques sont des inhibiteurs non sélectifs de la recapture de la 5-HT, de la noradrénaline et de la dopamine. Tout comme les IMAO, ils augmentent donc dans la fente synaptique les concentrations de ces trois neurotransmetteurs. Ces molécules regroupent notamment l'imipramine, l'amitriptyline et la désipramine. (Frazer and Benmansour 2002; Gelenberg and Chesen 2000; Sechter 1995). Afin de palier les effets indésirables des IMAO au niveau des systèmes cardiovasculaire et endocrinien ainsi que des troubles sexuels (Sechter 1995), et d'améliorer l'efficacité des traitements antidépresseurs, de nouvelles classes de molécules plus sélectives ont été développées.

### *Les inhibiteurs sélectifs de recapture de la 5-HT (ISRS)*

Des traitements plus spécifiques du système sérotoninergique ont été élaborés à la fin des années 1980 dont les plus prescrits sont la fluoxétine, dont le nom commercial est le Prozac®, et le citalopram. Leur sélectivité permet de réduire les effets secondaires des traitements précédents notamment sur le plan cardiovasculaire. Ils sont également prescrits dans le traitement des troubles obsessionnels compulsifs et des troubles de l'alimentation. En dehors du syndrome de sevrage lié à l'arrêt du traitement, le principal effet secondaire est le syndrome sérotoninergique caractérisé par divers symptômes neuropsychiques, neurovégétatifs et musculaires tels qu'une agitation, des myoclonies, une hyperréflexie, une forte sudation, des frissons, des tremblements, une diarrhée, une incoordination ou une hyperthermie (Sproule et al. 1997 ; Mégarbane and Delahaye, 2003).

### *Les inhibiteurs sélectifs de recapture noradrénaline (IRN) ou de la recapture associée de la 5-HT et de la noradrénaline (IRSN)*

Les IRN, comme la réboxétine, bloque de manière sélective la recapture de la noradrénaline (Brunello et al. 2002). Les IRSN bloquent la recapture à la fois de la 5-HT et de la noradrénaline. Parmi ces molécules, on distingue le venlafaxine, le milnacipran ou la duloxétine (Zerjav, Tse, and Scott 2009).

### *Antidépresseurs atypiques*

Une autre classe d'antidépresseur, dite « atypique », a été développée plus récemment. Ces composés agissent indirectement sur la disponibilité en monoamines en empêchant leur recapture pré-synaptique et donc entraînant une augmentation synaptique de ces derniers. Parmi eux, on peut notamment citer les antagonistes d'autorécepteurs adrénergiques tels que la miansérine (Millan 2006). D'autres molécules ont un spectre d'action plus vaste, comme la mirtazapine qui possède le même mécanisme d'action que la miansérine, auquel s'ajoute un effet sur la voie sérotoninergique, en bloquant aussi les récepteurs sérotoninergiques 5-HT<sub>2A</sub>, 5-HT<sub>2C</sub>, 5-HT<sub>3</sub> (Croom et al. 2009; Leinonen et al. 1999). De même, plusieurs molécules, comme la néfazodone ou l'étopéridone, sont à la fois des antagonistes des récepteurs 5-HT<sub>2A</sub> ou alpha1 adrénergiques ainsi que des inhibiteurs de la recapture de la 5-HT, de la noradrénaline ou de la dopamine. L'agomélatine, dont le nom commercial est le Valdoxan®, constitue une nouvelle alternative récemment étudiée dans le traitement de la dépression (AFSSAPS, 2010). Ce composé est à la fois un agoniste des récepteurs de la mélatonine (MT1 et MT2) et un antagoniste des récepteurs sérotoninergiques 5-HT<sub>2C</sub>. Ainsi, il normalise les rythmes circadiens et améliore la qualité du sommeil, en synchronisant le cycle



veille/sommeil, (Dugovic et al. 1989; Srinivasan et al. 2012). Il a par ailleurs une affinité négligeable vis-à-vis des autres récepteurs ou transporteurs, limitant ses effets secondaires (Srinivasan et al. 2012).

## C) Troubles anxieux

### 1) Généralités

Les troubles anxieux comptent parmi les troubles mentaux les plus courants, leur prévalence au cours de la vie étant de 14 % en Europe (Alonso et al., ESEMeD/MHEDEA 2000 Investigators, European Study of the Epidemiology of Mental Disorders (ESEMeD) Project 2004). Les deux critères utilisés pour distinguer l'anxiété normale du trouble anxieux sont la souffrance personnelle et la difficulté de fonctionner. Si l'anxiété est tellement forte qu'elle affecte la capacité de fonctionner normalement, au travail, en société ou dans d'autres domaines, l'anxiété est alors considérée comme un trouble. Parmi les troubles anxieux on retrouve la phobie sociale, le syndrome de stress post-traumatique (PTSD), la panique, les troubles obsessionnels compulsifs (TOC), la phobie spécifique et le trouble d'anxiété généralisée (TAG). On retrouve ces troubles anxieux par exemple chez des enfants ayant des pathologies douloureuses avérées (Otu-Nyarko et al. 2015), ou ayant subi certains stress de type affectif (interaction négative avec les parents par exemple, ou avec des camarades d'école) ou non (maladies chroniques) (Belhadj Kouider and Petermann 2015). Les survivants de catastrophes naturelles sont aussi sujets à de telles pathologies (Perricone et al. 2014).

La phobie spécifique et le trouble d'anxiété sociale sont les plus courants, leurs taux de prévalence au cours de la vie étant de 18,4 et de 13,0 %, respectivement (Kessler et al. 2012). La persistance des troubles anxieux amènent à un épuisement progressif physique, provoquant des pathologies métaboliques (hypertension, diabète...) et psychologiques amenant à la dépression et au burn-out. Les symptômes définissant les troubles anxieux sont:

- **Tension motrice** : fatigue, tension musculaire, agitation ou surexcitation ;
- **Hypervigilance** : difficultés de concentration, troubles du sommeil, irritabilité ;
- **Troubles associés** : mains froides et humides, bouche sèche, sueurs, nausées ou diarrhée, besoin d'uriner fréquent, difficultés à avaler tremblements, contractions, douleurs, endolorissement musculaire, syndrome du côlon irritable, céphalées, palpitations cardiaques et hypertension .

## **2) Pharmacothérapie**

L'anxiété est caractérisée par une diminution de l'activité GABAergique centrale globale (Goddard et al. 2001; Goddard et al. 2004; Roy-Byrne et al. 2006). Les traitements anxiolytiques vont donc agir sur ce système GABAergique mais étant peu spécifique, les effets secondaires sont nombreux. En effet, les premiers anxiolytiques (tranquillisants) utilisés étaient des médicaments sédatifs puissants qui soulageaient l'anxiété en réduisant l'état de vigilance du patient. L'angoisse diminuait au prix d'une somnolence plus ou moins permanente. Depuis une trentaine d'années, des médicaments mieux ciblés sont apparus. Ils soulagent les symptômes anxieux sans entraîner de tels effets indésirables.

Certains médicaments antidépresseurs inhibiteurs de la recapture de la sérotonine et de la noradrénaline sont également prescrits dans certaines formes invalidantes d'anxiété: anxiété généralisée, paniques, phobie sociale, mais leur efficacité contre l'anxiété n'est pas immédiate, il faut au moins deux à trois semaines pour en ressentir les effets bénéfiques. Une durée de traitement d'au moins six mois semble nécessaire pour une guérison durable. L'arrêt du traitement se fait progressivement pour éviter d'éventuels effets indésirables liés à cet arrêt. Certains neuroleptiques sont également indiqués pour traiter certains états anxieux, notamment en cas d'échec des autres traitements habituellement utilisés. Une substance habituellement prescrite contre l'épilepsie, la prégabaline (Lyrica), a montré une efficacité dans le traitement des symptômes du trouble anxieux généralisé.

## **3) Modèles de stress induisant des états anxieux (temporaires) chez l'homme**

La prise de parole en public (Merz and Wolf 2015) ou par exemple le sport de compétition (Romyn et al. 2015) induisent des comportements de type anxieux. De nombreuses études ont aussi modélisé des états anxieux temporaires chez l'homme. Les modèles les plus fréquents utilisent la présentation de photos ou de vidéos ayant un contenu à caractère anxiogène (visages exprimant la peur, vidéos de catastrophes naturelles, sons et musiques effrayantes, ...) (Lotzin et al. 2015 ; Kunze et al. 2015).

Pour pouvoir étudier en détail les altérations cardiorespiratoires induites par ces états anxiodépressifs, il a fallu mettre au point des modèles animaux.

## **IV) Modèles animaux de stress**

Selon McKinney et Bunney, la validation d'un modèle animal repose sur trois critères (McKinney and Bunney 1969) pour avoir une signification sur le plan physiopathologique :

- l'homologie : l'induction de la pathologie doit avoir des causes semblables à celles qui sont à l'origine de la maladie chez l'Homme.
- l'isomorphisme : le modèle est phénotypiquement similaire et induit les mêmes symptômes et signes comportementaux et physiologiques observés chez l'humain.
- la prédiction : les thérapies cliniques sont efficaces dans le modèle pour faire disparaître les symptômes.

Il existe différents modèles pour induire un état de type dépressif ou anxieux chez les rongeurs. Si l'on se réfère au critère d'homologie, l'exposition à un stress représente un des facteurs environnementaux associés au développement de troubles anxiodépressifs (Keller et al. 2007; Kendler et al. 1999; Kessler 1997). Ainsi, les nombreux protocoles développés diffèrent selon la nature (physique, psychologique), la sévérité, la durée d'exposition et enfin le caractère prévisible ou non du stress. Les protocoles de stress chroniques sont considérés comme les mieux adaptés pour modéliser les troubles anxiodépressifs (Schmidt et al. 2008) mais il existe aussi des modèles génétiques pour étudier la dépression et l'anxiété. Les modèles basés sur un stress chronique sont souvent similaires entre les modèles d'anxiété et de dépression, et il n'est pas rare d'observer des comportements de type anxieux dans des modèles atypiques de dépression. Il est donc très important de valider ces modèles avec des tests spécifiques, et des traitements pharmacologiques adaptés.

### **A) Modèles non basés sur l'interactivité**

#### **1) Modèles de stimuli douloureux**

Une réaction de défense peut être observée après l'application de stimuli douloureux, mécaniques ou thermiques. Dans ces modèles, la patte ou la queue de l'animal sont par exemple soumises à des contraintes mécaniques. Ainsi, Gau et collaborateurs (Gau et al. 2013) ont appliqué aux animaux une seule procédure expérimentale constituée de plusieurs stimuli (frottement, pression, ..) aux pattes et à la queue. De même, l'application de filaments de Von Frey (rigides, induisant des pressions d'intensité différentes) est utilisée pour induire

un stress. On peut également plonger la patte de l'animal dans un bain chaud, de température supérieure à 42°C (au-delà du seuil de la douleur (Garcia-Larrea 2012)). Ou au contraire, l'application d'un environnement froid, pouvant aller jusqu'à une température de -25°C, induit aussi des réponses physiologiques et comportementales caractéristiques du stress (Zhang et al. 2015). **La chronicité de ces types de stress thermique induit des comportements de type dépressifs (Wallace et al. 2014).** Egalement, le principe du modèle de chocs électriques est d'envoyer des impulsions électriques brèves dans la cage de l'animal testé. Ce modèle repose sur une peur conditionnée : un stimulus non stressant (son, lumière...) précède le choc électrique. L'animal apprend donc qu'après le stimulus conditionnant viendra le choc. Après plusieurs répétitions, l'animal est conditionné et anticipe le choc électrique par des comportements de type freezing ou vocalisation. **Ce modèle est décrit comme un bon modèle de PTSD (Siegmund and Wotjak 2007) et induit des comportements de type « anxieux » (Louvart et al. 2006).**

Les modèles de stress douloureux peuvent aussi utiliser **la ligature de différents nerfs**. Ainsi, il a été montré que la ligature du nerf spinal (Zhang et al. 2015), du nerf facial (Wallace et al. 2014), et du nerf sciatique (Duan et al. 2015) par exemple, peuvent induire des comportements de **type dépressifs** (Brüning et al. 2015). La douleur viscérale, que l'on peut induire par le placement d'un ballon gonflable au niveau colorectal, évoque aussi une hypersensitivité viscérale (Liu et al. 2015), mais qui elle est plutôt associée à **un état anxieux**.

## **2) Modèles de stimuli non-douloureux**

L'application (10 L/min/10 minutes) d'un jet d'air sur la tête de l'animal confiné dans une chambre plastique, donc ne pouvant échapper à ce stress, constitue un modèle fiable d'anxiété temporaire et réversible (Vaz et al. 2015). De même, les animaux peuvent être soumis à différents stimuli stressants dans une même procédure expérimentale. Par exemple, dans l'étude de Kabir en 2010 (Kabir et al. 2010), on a présenté à des rats différents stimuli séparés par 5 min de pause, comme un tapotement sur la cage, mouvements latéraux de l'expérimentateur, allumage d'une lumière forte dirigée vers la cage, ou bruits forts. **Ce type de stimulus appliqué de façon chronique induit des comportements de type dépressif (Azman et al. 2015).**

### **3) Modèles basés sur la nouveauté**

Par nature, les animaux sont rassurés de se retrouver dans un environnement familier. Ainsi, tout changement dans la cage (litière, nourriture, ...) peut être préjudiciable et la capacité exploratrice de l'animal est alors diminuée. **Ainsi, la diminution de l'exploration est associée à un comportement anxieux (Thanos et al. 2015).**

### **4) Modèles de contention**

Les animaux sont placés dans des tubes afin de contraindre l'animal à ne pas bouger. La contention peut être aiguë et longue (3 à 4 heures) ou bien chronique (30 min par jour pendant 3 à 4 jours). **Ce modèle induit des comportements de type anxieux chez les rongeurs (Manchanda et al. 2011; Mongeau et al. 2010 ; Imbe et al. 2004).**

### **5) Modèle du stress chronique modéré (SCM) ou « Chronic Mild Stress » (CMS)**

Le paradigme de stress chroniques modérés (SCM) est fondé sur la découverte initiale du Dr Katz, selon laquelle l'exposition à des stress chroniques, chez le rat, produit un syndrome comportemental, motivationnel et neuroendocrinien assimilable aux troubles émotionnels chez l'humain (Katz 1982). Actuellement, divers protocoles sont décrits dans la littérature et varient selon plusieurs paramètres. Les animaux peuvent subir un ou plusieurs stress quotidiens, pendant des périodes allant de une à neuf semaines (Griebel et al. 2002; Grippo et al. 2003; Grippo et al. 2002; Grippo et al. 2005; Sandi and Touyarot 2006; Vyas et al. 2002; Willner et al. 1987). Les stress utilisés regroupent, entre autres, des perturbations de l'alternance jour/nuit (Grippo et al. 2005; Vyas et al. 2002; Willner et al. 1987), des chocs électriques (Katz 1981; Sandi and Touyarot 2006), des périodes plus ou moins longues de privation de nourriture et d'eau (Grippo et al. 2005; Katz 1981; Muscat and Willner 1992; Vyas et al. 2002; Willner et al. 1987), l'humidification de la sciure (Willner, Muscat, and Papp 1992), des éclairagements stroboscopiques (Bortolato et al. 2007; Forbes et al. 1996) et des sons plus ou moins intenses (Forbes et al. 1996; Schweizer et al. 2009).

**Pour certains auteurs, ces protocoles entraînent des altérations physiologiques et comportementales, conduisant à la proposer comme modèle de dépression (Willner 1995; Willner et al. 1992).** Chez le rat adulte, le SCM induit une anhédonie, accompagnée d'une diminution de l'activité exploratoire dans un nouvel environnement, d'une augmentation de la période d'immobilité lors du test de la nage forcée, et d'une hyperactivité de l'axe HHS (Willner and Mitchell 2002; Willner et al. 1996). Ces modifications sont prévenues par des

traitements antidépresseurs tels que les composés tricycliques, les IMAO et les thérapies électroconvulsives (Katz 1981; Katz 1982; Katz and Hersh 1981; Katz et al. 1981; Roth and Katz 1981). **Pour d'autres auteurs, probablement en raison de la nature moins sévère des stress et de la différence de sensibilité selon la souche de rat considérée, les modifications à long terme sont beaucoup plus modestes**, avec par exemple une légère hyperactivité de l'axe HHS ou une faible modification de la consommation d'eau sucrée (caractérisant une anhédonie) (Kioukia-Fougia et al. 2002; Wu and Wang 2010).

### 6) Modèles génétiques

Flinders sensitive line (FSL) : les rats Flinders sensitive line (FSL) correspondent à des souches développées à partir de rats Sprague-Dawley. Cette lignée est un modèle génétique **validé de dépression**, avec des similitudes comportementales et neurophysiologique (Hasegawa et al. 2006; Zangen, Overstreet, and Yadid 1997; Zangen et al. 1999). En effet, les rats FSL, tout comme les patients dépressifs, ont des troubles du sommeil et sont hypersensibles aux agents cholinergiques (Overstreet et al. 2005) et ont une hyperactivation sympathique. De plus, ils présentent une immobilité accrue dans le test de la nage forcée, une diminution de l'appétit ainsi qu'une réduction de la fonction psychomotrice, mais aucune altération des réponses hédoniques, ni aucun dysfonctionnement cognitif (Overstreet 2012; Overstreet et al. 2005).

Wistar-Kyoto (WKY) : Les rats Wistar-Kyoto (WKY) proviennent d'une souche sensible au stress, manifestant un **profil de type « dépressif »** et adoptant préférentiellement des stratégies passives (Pearson et al. 2006; Will et al. 2003). Ils présentent une hyper réactivité au stress (Paré 1992b; Paré 1992a; Paré 1994; Paré and Redei 1993; Redei et al. 1994; Rittenhouse et al. 2002).

**Plusieurs lignées de rongeurs ont été créées à partir d'animaux présentant un profil de type anxieux.** La première fut développée en 1954 par Broadhurst et basé sur le nombre de défécation en phase exploratoire. La lignée se nomme Maudsley Reactive (MR: high-defecating; i.e., anxiété élevé) and Maudsley Non-Reactive (MNR:low-defecating; i.e., anxiété faible). Après seulement 4 générations de sélection de lignées, la différence entre MR et MNR est significative (Broadhurst 1957; Broadhurst 1958).

Sur le même principe, d'autres lignées ont été créées plus récemment en se basant sur les tests comportements cités dans le paragraphe ci-dessous (Chapitre II paragraphe IV)C)). D'après

l'étude de Gomez et al en 2013, 8 lignées seraient utilisées pour étudier l'anxiété (Gomes et al. 2013): "Maudsley Reactive and Non-reactive, Floripa High and Low, Tsukuba High and Low Emotional, High and Low Anxiety-related Behavior, High and Low Ultrasonic Vocalization, Roman High and Low Avoidance, Syracuse High and Low Avoidance et Carioca High and Low Conditioned Freezing".

Du fait de l'étiologie multifactorielle de l'anxiété (génétique, environnemental...) et de la présence de deux sous-groupes au sein de chaque lignée (l'un résistant, l'autre sensible), l'établissement de ces lignées montrent principalement qu'il existe des différences génétiques amenant à une prédisposition à un état de type anxieux (Carnevali et al. 2014).

### **7) Modèles de stress prénataux**

L'environnement durant le développement embryonnaire peut avoir un impact sur le développement du système nerveux et affecter les comportements futurs des individus.

**Ainsi, un stress prénatal chez les rats induit à long terme une hyperactivité de l'axe HHS (Liaudat et al. 2015; Xu et al. 2014), des comportements de type anxieux (Van den Hove et al. 2005) ou dépressifs (Wang et al. 2015) suivant l'intensité du stress, ou encore des déficits cognitifs (Barzegar et al. 2015; Lordi et al. 2000).** Les mécanismes à l'origine de ces maladaptations sont probablement dus à l'exposition aux corticostéroïdes sécrétés par la mère gestante lors des phases de stress (Maccari et al. 2003; Weinstock 2011).

## **B) Modèles basés sur l'interactivité**

### **1) Modèles de stress néonataux**

Un stress chronique appliqué aux nouveau-nés pendant les premières semaines de vie induisent des modifications à long terme du comportement et du fonctionnement de l'axe HHS (Liu et al. 2000; Liu et al. 1997; Meaney 2001). **Ces modèles provoquent des phénotypes de type anxieux (Bouffleur et al. 2013) ou dépressifs (Kuramochi and Nakamura 2009; Ko et al. 2014) à l'âge adulte.** Les soins maternels influent également sur les réponses endocrines, émotionnelles et cognitives au stress (Champagne et al. 2003; Campos et al. 2013). On retrouve donc des effets semblables aux stress pré-nataux.

### **2) Défaite sociale**

Chez l'Homme, la perte du statut social et de l'accès aux ressources, aussi bien que les conflits internes avec la hiérarchie, représentent des facteurs prédisposant à l'apparition d'un



état anxieux et/ou dépressif (Nesse 1999; Rohde 2001). En se fondant sur ces observations, des protocoles de stress social ont été élaborés chez l'animal. Chez le rongeur, la défaite sociale est considérée comme l'un des plus sévères stress en termes d'activation neuroendocrinienne. Les conséquences d'un seul épisode de défaite sociale pouvant durer jusqu'à plusieurs semaines après ce stress, les animaux deviennent alors plus sensibles à l'application ultérieure de stress mineurs (Koolhaas et al. 1997). **Il existe différents protocoles basés sur la défaite sociale chez le rat qui peuvent alors induire des comportements anxieux (Rivat et al. 2010) ou dépressifs (Becker et al. 2008 ; Carnevali et al. 2012).** Chez la souris C57bl/6, on observe deux populations à la suite du protocole de défaite, l'une définie comme « sensible » et l'autre comme « résistante » à des stress émotionnels (Krishnan et al. 2007). Les animaux « résistants » manifestent dès le lendemain du protocole un temps d'interaction sociale important, un poids corporel constant, une préférence au sucrose maintenus et passent plus de temps au centre de l'Open Field, alors que chez les animaux « sensibles », ces paramètres sont diminués et le restent pendant plus d'une semaine. Il faut noter que même avec un fond génétique identique, des phénotypes différents peuvent aussi apparaître après la défaite sociale (Tsankova et al. 2006; Wong et al. 2005). Ainsi, des animaux présentant un profil de type passif, caractérisé par une soumission dans le test résident/intrus, développent une anhédonie et une immobilité dans le test de la nage forcée, à la suite de l'application d'un stress chronique, alors que les animaux présentant un profil de type proactif ne développent pas ce phénotype (Strekalova et al. 2004)..

### 3) Modèles de déprivation sociale et sensorielle

Les modèles de déprivation sociale s'appuient sur l'isolement, et la déprivation sensorielle est induite par une ablation bilatérale des bulbes olfactifs (bulbectomie olfactive). **Ces modèles entraînent certains comportements associés à la dépression**, tels qu'une diminution de la consommation de nourriture, une perte de poids, une anhédonie ainsi qu'une augmentation de l'activité locomotrice (Willner 1991). Le phénotype dépressif est réversé par l'administration d'un traitement antidépresseur (Cairncross et al. 1977; Cairncross et al. 1977; Cairncross et al. 1978; Willner 1984; Brenes and Fornaguera 2009; Garzón et al. 1979; Heritch et al. 1990). **La déprivation est souvent utilisé pour étudier la dépression mais les rats présentent également des comportements de type anxieux.** En effet, on retrouve une hyperactivité dans l'Open Field chez ces animaux et ils passent moins de temps dans les bras ouverts du test du Plus Maze (Wang et al. 2007). Il est à noter que les effets sont plus marqués chez les animaux



connus pour leur sensibilité sociale, comme le rat, que chez la souris, un rongeur plutôt territorial (Lapiz et al. 2003; Syme 1973).

### **C) Tests comportementaux et physiologiques**

Le diagnostic de la dépression et de l'anxiété chez l'humain repose principalement sur des dimensions subjectives et impossibles à transposer directement aux animaux. Ainsi, plusieurs tests comportementaux et physiologiques ont été élaborés pour diagnostiquer des symptômes de type dépressif et anxieux chez les animaux. Pour cela, diverses mesures biochimiques, anatomiques et comportementales ont été validées. Un test comportemental est un outil permettant d'évaluer certaines caractéristiques psychologiques d'un individu dans une situation et à un moment donné. Dans la modélisation animale, il permet de révéler un comportement associé à un symptôme retrouvé dans la pathologie humaine. Il s'avère donc fort utile pour apprécier la validité d'un modèle animal.

Certains des tests présentés dans ce paragraphe sont largement utilisés pour apprécier le pouvoir antidépresseur ou anxiolytique potentiel d'une molécule.

#### **1) Diagnostic des symptômes de type dépressifs**

##### ***(i) Test de la nage forcée et test de suspension par la queue***

Le test de la nage forcée et le test de suspension par la queue constituent des tests très largement utilisés chez le rongeur, pour déterminer l'action antidépressive d'une molécule (Nestler et al. 2002). Dans ces deux situations expérimentales, l'animal est soumis à une situation stressante à laquelle il ne peut pas échapper et le symptôme estimé est donc la résignation.

Le test de la nage forcée a été initialement mis en place par Porsolt (Porsolt et al. 1977). Les animaux sont immergés dans un cylindre rempli d'eau, dont la température varie selon les études de 23 à 30° C, et leur comportement est observé. Généralement, les animaux font immédiatement preuve d'une nage active et de tentatives d'échappements (« swimming » et « climbing »), avant de s'immobiliser. On considère que cette immobilisation correspond à l'adoption d'une réponse passive de résignation face à un stimulus stressant. Par conséquent, sa durée et/ou sa latence d'apparition est enregistrée. Une molécule est définie comme antidépressive lorsque la durée des comportements actifs et/ou la latence d'apparition de l'immobilité sont augmentées alors que le temps d'immobilité est réduit. Néanmoins, cette interprétation est sujette à discussion. En effet, un comportement actif prolongé consent

beaucoup d'efforts et réduit alors les chances de survie de l'animal, par rapport à un congénère économisant ses mouvements. Ainsi, l'immobilité peut être aussi interprétée comme une réponse pertinente et adaptée visant à accroître les chances de survie (Bruner and Vargas 1994; Calil and Marcondes 2006). Quoi qu'il en soit, malgré ce débat, ce test permet de sélectionner, avec semble-t-il une certaine réussite, les futurs antidépresseurs (Cryan et al. 2002; Porsolt et al. 1977).

Le test de suspension par la queue est préférentiellement utilisé chez la souris. Il consiste à suspendre l'animal par la queue au niveau d'une attache de l'enceinte du dispositif. De la même manière, l'animal se débat dans un premier temps, essayant de se libérer, puis adopte ensuite un comportement d'immobilité, assimilé à une réponse de résignation face à cette situation stressante. Lors de ce test, il est possible de mesurer le temps d'immobilité total et/ou la latence d'immobilité, ainsi que la puissance des mouvements déployés et leur valeur en énergie si le matériel le permet. Comme dans le test de la nage forcée, des propriétés antidépressives sont attribuées à une molécule lorsque le temps pendant lequel l'animal suspendu par la queue se débat, est augmenté (Cryan et al. 2005).

#### ***(ii) Test de toilettage provoqué (« splash test »)***

L'attention et les soins portés à soi sont réduits de manière drastique chez les patients dépressifs, ce qui reflète une baisse de l'estime de soi, ainsi qu'une perte d'intérêt. Le comportement équivalent chez l'animal est le toilettage, qui est défini comme le nettoyage du poil par léchage ou grattage, du museau et de la face avec des mouvements semi-circulaires par-dessus la tête et derrière les oreilles (Kalueff and Tuohimaa 2004; Yalcin et al. 2005). Le test de toilettage provoqué ou « splash test » est conçu pour évaluer ces soins chez les rongeurs, mais demeure essentiellement appliqué chez la souris. Lors de ce test, une solution de sucrose à 10 % est versée sur le pelage dorsal de la souris dans sa cage. Le nombre de léchage est comptabilisé pendant les 5 minutes qui suivent (Ducottet and Belzung 2004; Yalcin et al. 2008). En parallèle, une évaluation de l'état du poil peut aussi être effectuée afin d'estimer l'intérêt que l'animal porte à son pelage. Elle consiste à faire la somme des scores attribués aux différentes parties du corps comme la tête, la nuque, le dos, le ventre, la queue, les pattes avant et arrière, ainsi que les régions génitales (Ducottet et al. 2004; Ducottet and Belzung 2004). Un score de 0 est attribué à un pelage bien entretenu et toiletté, et un score de 1 à un pelage négligé et peu soigné. Ces mesures sont sensibles au stress et répondent aux traitements antidépresseurs chroniques (Yalcin et al. 2005).

***(iii) Test d'alimentation supprimée par la nouveauté (« novelty suppressed feeding »)***

Ce test repose sur une situation de motivation conflictuelle entre l'accès à de la nourriture et la peur de s'aventurer au centre d'une enceinte inconnue (David et al. 2007). Il permet de révéler un comportement d'hyponéophagie, qui se définit comme l'inhibition du comportement d'alimentation induite par une exposition à la nouveauté (Dulawa and Hen 2005). Il consiste à placer des animaux préalablement privés de nourriture dans un nouvel environnement au centre duquel leur nourriture habituelle est disposée. La latence de consommation, définie lorsque l'animal utilise ses pattes antérieures pour saisir et mordre la boulette, est mesurée. A la fin du test, les animaux sont replacés dans leur cage et la quantité de nourriture consommée en 5 minutes est mesurée, afin d'éliminer tout biais expérimental relevant d'une modification de l'appétit (David et al. 2007; Santarelli et al. 2001; Stedenfeld et al. 2011).

Ce test, utilisé pour la mesure de comportements associés à la dépression, est principalement associé à l'action des antidépresseurs (David et al. 2007; Santarelli et al. 2003). Uniquement l'administration chronique d'antidépresseur réduit la latence de consommation de la nourriture, conférant à ce test une excellente validité prédictive (Bodnoff et al. 1988; Stedenfeld et al. 2011). Néanmoins, ce paradigme modélise également les comportements de type « anxieux ». De fait, la latence de consommation de la nourriture est une variable sensible aux anxiolytiques (Dulawa and Hen 2005).

***(iv) Test d'interaction sociale***

Le test d'interaction sociale, développé par File & Hyde (File and Hyde 1978), fournit un paradigme permettant d'étudier les comportements sociaux. Sa réalisation ne requiert aucun entraînement de l'animal. Il consiste à permettre à un rongeur d'explorer librement un congénère non-familier dans sa propre cage d'élevage ou dans un environnement neutre pendant 5 à 10 minutes. L'exploration sociale est reflétée par le temps passé par l'animal autour du congénère, ainsi que par la quantité et la durée des comportements qui composent les interactions sociales comme le reniflement, la poursuite, le toilettage du congénère, le fait de monter sur ou de ramper sous le congénère, la lutte ou encore les morsures (D'Aquila et al. 1994; File and Seth 2003; Overstreet and Griebel 2004). Ainsi, une diminution de ces comportements est interprétée comme un évitement social. Ce symptôme, tout comme

l'anhédonie, est cependant commun aux pathologies anxieuses (File and Hyde 1978; Johnston and File 1991; Rex et al. 2004).

La perte d'intérêt étant un des symptômes centraux dans la dépression chez l'Homme, le comportement socio-sexuel chez les animaux peut aussi servir d'index dépressif. Ce test consiste à mettre le rongeur mâle en présence d'une femelle sexuellement réceptive, par l'injection préalable d'œstradiol et de progestérone. Le comportement sexuel du mâle est évalué au travers de la latence et du nombre de comportements d'exploration des parties génitales de la femelle par des léchages ou du toilettage et des pincements, ainsi que la durée de poursuite de la femelle par le mâle. Ce test dure environ 20 minutes (D'Aquila et al. 1994).

## **2) Diagnostic des symptômes de type anxieux**

### **(i) Test du labyrinthe en croix surélevé ou « Elevated Plus Maze (EPM) »**

L'Elevated Plus Maze (EPM) est le test le plus populaire pour mesurer l'anxiété chez les rongeurs. Il est aussi couramment utilisé pour tester différents anxiolytiques. Le labyrinthe, en forme de croix, possède deux corridors fermés et deux ouverts (sans murs). Le test crée un conflit approche-évitement entre l'envie naturelle d'explorer du rongeur et sa peur des espaces ouverts (qui le protège des prédateurs). L'anxiété est mesurée par le temps que passe l'animal à explorer les corridors « ouverts » et « fermés ». Il est admis que plus un animal est anxieux, moins il passera de temps dans les corridors ouverts. Ce test est sensible aux anxiolytiques et a été évalué chez le rat et chez la souris (Dawson and Tricklebank 1995; Lister 1987). Le test inclut également des mesures éthologiques d'évaluation du risque par certaines postures, comme l'étirement. On peut aussi noter les fréquences de nettoyage de l'animal pendant le test, qui augmente lorsque l'animal est anxieux.

### **(ii) Open Field**

Ce test analyse le comportement exploratoire du rongeur dans un espace clos. On l'utilise avant tout pour mesurer ses fonctions motrices, mais aussi pour évaluer son degré d'anxiété (Asano 1986; Mechan et al. 2002; Whimbey and Denenberg 1967). Un animal anxieux évite le centre du terrain qui est ouvert, et reste près des murs. On peut faire varier le niveau de stress de plusieurs façons : en modifiant l'intensité lumineuse de « l'Open Field », sa couleur (le blanc est plus stressant que le noir), ou sa taille.

### ***(iii) Light Dark Test***

Dans ce test, on permet à l'animal d'explorer une arène formée de deux compartiments : l'un éclairé, l'autre sombre. Les rongeurs, étant nocturnes, évitent les endroits très éclairés. Ainsi, plus l'animal est anxieux, plus son exploration se réduira au compartiment sombre. Ce test est également sensible aux traitements anxiolytiques (Crawley 1981).

### ***(iv) Test d'enfouissement défensif***

Ce test permet une mesure de l'anxiété sous une forme différente de celle des tests classiques basés sur l'exploration d'un dispositif nouveau. Ici l'animal est confronté, dans un milieu familier, à un stimulus aversif sous la forme d'une électrode qui délivre un courant électrique de très faible intensité au 1er contact. L'animal répond alors par un comportement défensif naturel : la réponse d'enfouissement. Celle-ci consiste à projeter de la sciure sur l'électrode avec ses pattes antérieures. Cette réponse est modulable par les anxiolytiques classiques ainsi que par des lésions, notamment au niveau du septum ou de l'amygdale (Treit et al. 1981).

## **V) Comorbidité des pathologies cardiorespiratoires et anxiodépressives**

### **A) Notions Générales**

L'association bidirectionnelle entre les pathologies cardiovasculaires et les troubles psychiatriques n'est plus à démontrer. Par exemple, la proportion de symptômes dépressifs chez les patients ayant eu un infarctus du myocarde atteint 45% (Schleifer et al. 1989) alors que la dépression n'a une prévalence que de 5 à 10% au sein de la population générale (American Psychiatric Association, 2000). De plus, la dépression a une incidence sur l'apparition de pathologies cardiovasculaires chez des individus n'ayant jamais eu d'historique physiopathologique cardiovasculaire (Carney et al. 2000; Penninx et al. 2001; Anda et al. 1993; Barefoot et al. 1996). C'est également le cas chez les patients souffrant de troubles de paniques ou de troubles anxieux, qui ont un risque accru de développer des pathologies cardiaques (Coryell et al. 1986; Weissman et al. 1990; Kawachi et al. 1994; Schleifer et al. 1989; Ahern et al. 1990; Ladwig et al. 1991).

## **B) Modifications cardiovasculaires induites par le stress**

### **1) Altération du SNA sympathique**

La mise en situation de stress aigu modifie clairement l'équilibre du SNA. Ainsi, lors de l'application d'un stress psychologique aigu chez des sujets tels que des tâches arithmétiques, la PA et la FC augmentent à la suite d'une suractivation sympathique (Caceres and Burns 1997), et le ratio LF/HF est augmenté (Chen et al. 2015). De plus, des sujets subissant un test de stress social aigu par la mise en situation de prise de parole publique subissent une élévation de l'activité de l'axe HHS (élévation du taux d'ACTH et du cortisol), associée à des modifications sympathiques (Kudielka et al. 2004). D'autres types de stress aigu induisent aussi des variations de la FC, comme par exemple dans les modèles utilisant des stimuli douloureux. Ainsi, l'application d'un stress thermique chaud au niveau des membres inférieurs a induit chez un groupe de sujets de telles modifications sympathiques (Shibasaki et al. 2015). De même, des sujets subissant l'exposition à un environnement froid montrent une élévation claire de la PA systolique, et la réactivité à ce test est un prédicteur de l'incidence d'hypertension dans ce groupe (Zhao et al. 2015). Une association entre valeurs hautes des bandes LF et du ratio LF/HF avec la sensation de « perception stressante de la douleur » a été établie chez l'homme (Sesay et al. 2015). Une augmentation du tonus sympathique a aussi été retrouvée dans différents syndromes anxieux, l'anxiété phobique (Kawachi et al. 1995), l'anxiété généralisée (Thayer and Lane 2000), le stress post-traumatique (Cohen and Benjamin 2006; Mellman et al. 2004) et dans les troubles panique (Kawachi et al. 1995; Yeragani et al. 1993; Chang et al. 2013).

Chez l'animal, la « réaction de défense » provoquée expérimentalement induit une augmentation du débit cardiaque, de la FC et de la PA (Nosaka 1996 ; Gau et al. 2013). Ces modifications résultent d'une sympathoexcitation (Zhang et al. 2006; Verberne *et al.*, 1989; Nosaka, 1996). Egalement, des enregistrements téléométriques montrent que la mise en situation dans un nouvel environnement (Nalivaiko et al. 2011) ou l'application de bruit intense (Kabir et al. 2010), induisant une anxiété temporaire, augmentent la FC de manière importante. De même, les modèles de stress chronique induisant un profil anxieux, tel que les chocs électriques appliqués 4h pendant 14 jours, sont associés à une augmentation de la PA systolique (Dong et al. 2015). Plusieurs études de modèles animaux de peur conditionnée avec chocs électriques (modèle d'anxiété) montrent que la réexposition aux chocs induit une élévation rapide de la PA et une augmentation de la FC après un certain délai (Carrive 2000). Les mêmes résultats ont été retrouvés chez des animaux sélectionnés pour présenter un caractère de type anxieux (Ravenelle et al. 2014 ; Carnevali et al. 2014).

Si les patients anxiodépressifs ne présentent pas de façon évidente des modifications de la PA et de la FC de façon chronique, ils sont caractérisés par une modification de la VFC. Ainsi, s'il était connu que chez des patients déprimés qui présentaient auparavant des problèmes cardiovasculaires, la VFC a été retrouvée diminuée, indiquant un déséquilibre du SNA en faveur du tonus sympathique (Carney et al. 2000), ce phénomène a aussi été retrouvé chez des patients dépressifs n'ayant jamais eu de pathologies cardiaques (Gehi et al. 2005; Tulen et al. 1996). Par conséquent, il apparaît que la dépression a un impact néfaste et durable sur le SNA engendrant à long terme des complications cardiovasculaires.

L'activité sympathique est également largement augmentée dans de nombreuses études animales ayant utilisé des modèles de stress chronique pour induire la dépression. La procédure de stress social induisant des comportements de type dépressifs a été largement étudiée par le groupe de Grippo et collaborateurs, et une hyperactivité sympathique accompagnée d'une hypertrophie cardiaque a été mise en évidence (Grippo et al. 2002 ; Carnevali et al. 2012). Dans les lignées génétiques de dépression, les lignées Flinders montrent également une augmentation de l'activité sympathique (Padley et al. 2005). Cependant, il est intéressant de noter que dans un protocole basé sur la mémorisation de nombres pour les additionner par la suite (test de mémorisation en situation de stress), plus la réactivité cardiaque est importante, moins le score de dépression à long terme est important (Phillips et al. 2011).

## **2) Altération du SNA parasympathique**

De nombreuses études cliniques ont montré également, en plus de la VFC diminuée, une diminution de la sensibilité de la composante cardio-vagale du baroréflexe. En effet, les patients anxieux ont un baroréflexe spontanée réduit, et cette diminution est négativement corrélée au degré d'anxiété (Virtanen et al. 2003; Watkins et al. 1998). Les patients dépressifs présentent également une sensibilité du baroréflexe moindre (Davydov et al. 2007; Grippo and Johnson 2002; Watkins et al. 1999). Il est important de souligner qu'une baisse de réponse cardiaque associée à une baisse de la VFC sont des facteurs de risque important pour la survenue d'arythmie cardiaque (La Rovere et al. 1998) et donc peuvent être prédictifs de la survie à long terme chez les patients anxiodépressifs.

**Cette hyperactivité sympathique associée à l'altération du baroréflexe semblent être à l'origine de hypertension retrouvée chez les patients anxiodépressifs (Okada et al. 2012;**



**Mattace-Raso et al. 2007). Cependant, il faut noter que peu d'études animales ont focalisé sur le baroréflexe. Seules celles qui ont été basées sur le stress social ont étudié cette question, et elles n'ont pu mettre en évidence l'inhibition de la réponse cardiaque réflexe (Grippo et al. 2008). La modélisation de ces deux modifications (sympathique et parasympathique) était au centre des travaux de cette thèse.**

### **3) Effets des traitements anxiodépresseurs**

Certaines études ont montré qu'un traitement comprenant des antidépresseurs ou des anxiolytiques a un impact bénéfique sur la VFC et le tonus parasympathique chez les patients anxiodépresseurs (Balogh et al. 1993; Bär et al. 2004; McFarlane et al. 2001; Rechlin 1994). Cependant ces résultats sont controversés car il semblerait au contraire que les anxiolytiques et les antidépresseurs aient un impact plutôt négatif sur le tonus vagal. En effet, les benzodiazépines peuvent exercer un rôle vagolytique (Agelink et al. 2002). Il en est de même pour les diverses classes d'antidépresseurs prescrits. Les antidépresseurs tricycliques sont connus pour avoir des effets anticholinergiques (Feighner 1999), les inhibiteurs de la recapture de la norépinephrine diminuent la VFC (Schroeder et al. 2002), les inhibiteurs de recapture de la sérotonine et de la norépinephrine peuvent aussi diminuer la VFC et les inhibiteurs sélectifs de recapture de la sérotonine montrent des résultats aléatoires sur la VFC et les marqueurs d'activité vagale (Glassman et al. 2002). Au vu de ces données au sein de la littérature actuelle, il est important de mesurer le ratio bénéfice/risque pour les traitements pharmacologiques. En effet, malgré leur efficacité à long terme, leur effet néfaste sur la VFC serait susceptible d'augmenter les risques cardiovasculaires lors des traitements chez les patients antidépresseurs, d'autant plus que les traitements s'étalent souvent sur de longues périodes de plusieurs semaines à plusieurs mois. Chez l'animal, les modifications sympathiques induites par un stress social entraînant un profil dépressif ne sont que partiellement réversées par des traitements antidépresseurs (contrairement au comportement de type dépressif lui-même qui disparaît bien avec la fluoxétine) (Grippo et al. 2006).

## **C) Modifications respiratoires induites par le stress**

Les troubles de l'humeur et plus particulièrement les troubles anxieux semblent associés à des troubles respiratoires. Par exemple, une étude a montré qu'une population de patients ayant un profil anxieux présentait une hyperventilation (Rutten et al. 2015). Cette relation est d'ailleurs bidirectionnelle puisqu'il apparaît qu'une hyperventilation induite par des états



anxieux, serait à l'origine de symptômes somatiques qui eux-mêmes sont interprétés comme étant de nature « catastrophique », ce qui en retour augmente l'état d'anxiété (Ley 1985). Dans ces pathologies, l'hyperventilation se manifeste par une augmentation de la fréquence respiratoire et du volume courant (Yeragani et al. 2000; Masaoka et al. 2004; Grassi et al. 2013) corrélée au degré d'anxiété (Burkhardt et al. 2010) ou d'attaque de panique (Yeragani et al. 2000). De plus, l'hyperventilation induite par l'hypercapnie apparaît en général augmentée chez des patients ayant un profil anxieux (Masaoka et al. 2004) ou atteints d'attaque de panique (Yeragani et al. 2000; Yeragani et al. 2002). Un stress mental peut augmenter les réponses hyperventilatoires à l'hypercapnie (Freeman et al. 1986). De plus, un choc thermique induit de profondes modifications respiratoires chez l'homme, avec un gasp initial suivi d'une hyperventilation prononcée (Datta and Tipton 2006). Chez l'animal, la réaction de défense se traduit aussi par une hyperventilation (Hilton 1982).

Très peu d'études ont porté sur les pathologies dépressives mais celles-ci semblent associées à un pattern respiratoire différent. Par exemple, lorsque les patients sont atteints de mélancolie, on observe une diminution de la fréquence respiratoire (Averill 1969). De même, un stress chronique subi chez la mère pendant la grossesse induit de nombreuses altérations respiratoires chez le nouveau-né et peut notamment être à l'origine de la mort subite du nourrisson (Duncan et al. 2009). Un stress chronique chez l'animal peut aussi, dans certains cas, induire de telles modifications. Ainsi, la répétition à long terme de chocs électriques induit une baisse de la ventilation (Isom and Elshowihy 1982). Lors d'un stress produit chez le rongeur au cours de la phase tardive de la gestation (i.e. une odeur d'un assaillant ou des cadavres de congénères peuvent être placés pendant un certain temps dans la cage (Fournier et al. 2013)), des modifications respiratoires sont observées dès la naissance. En effet, l'augmentation physiologique de la ventilation basale avec l'âge est retardée de P2 à P4, mais uniquement chez les mâles (Fournier et al. 2013). De plus, dans cette étude, les auteurs montrent que l'hyperventilation hypoxique n'est présente qu'à partir de P2 chez les nouveau-nés ayant subi un stress dans leur phase gestationnelle alors qu'elle apparaît dès P0 chez les témoins. Ceci suggère une altération dans la maturation et/ou sensibilité des chémorécepteurs carotidiens, ou une altération de l'intégration centrale des informations qui en sont issues. Enfin, une étude utilisant le modèle génétique de rats FSL présentant un profil lié à la dépression a montré que la fréquence respiratoire était diminuée chez ces animaux (Padley et al. 2005).

### **D) Circuits neuronaux impliqués dans les réactions cardiorespiratoires induites par la réaction de défense**

A partir des premières études de Bard et Hess, l'hypothalamus est perçu comme étant la structure jouant un rôle central pour générer une réaction de défense (« fight or flight ») (Bard, 1928 ; Hess and Akert 1955). Dans les années 1940, Hess et ses collaborateurs ont stimulé électriquement la partie dorsale de l'hypothalamus sur des chats conscients provoquant des réponses autonomes et somatiques typiques de la réaction de défense (augmentation de la PA, piloérection, courbure du dos (Hess and Brugger, 1943). Plusieurs études ont approfondi ces observations sur d'autres espèces animales et montré que l'axe HHS, par le noyau paraventriculaire (PVN), était impliqué dans cette réaction cardiorespiratoire au stress (Duan et al. 1997 ; Arthur et al. 1991). Il est important de mentionner qu'il existe des voies de projections réciproques entre le PVN et la région dorsomédiane et périfornicale de l'hypothalamus (DMH/PeF) (Myers et al. 2014), et plusieurs études de DiMicco et collaborateurs ont suggéré que plus que le PVN, le DMH lui-même (étant aussi capable de produire le CRF) était à l'origine de la cascade d'activation de l'axe HHS (DiMicco et al. 2002 ; DiMicco et al. 2006). Certaines études ont montré qu'il y avait une augmentation de l'expression de la protéine Fos (marqueur d'activation neuronal) au sein du DMH lors d'un stress, et l'activation de cette région (Briski and Gillen 2001; Harris et al. 2005) par une stimulation électrique ou chimique entraîne des manifestations cliniques (piloérection, mouvement des vibrisses, exorbitation ophtalmique, soulèvement de la queue) et cardiorespiratoires (hypertension, tachycardie, inhibition de la bradycardie du baroréflexe et hyperventilation) caractéristiques de la réaction de défense (DiMicco et al. 2002; Gebber et Snyder 1970; Hockman et Talesnik 1971; Coote et al. 1979; Zhang et al., 2006). Le DMH est donc bien une région clé des réponses sympathiques et respiratoires au stress. De même, la substance grise périaqueducale dorsolatérale (dIPAG) est également une région clé et un point relais du DMH dans la mise en place des modifications cardiorespiratoires. En effet, sa stimulation chez le rat provoque des changements cardiorespiratoires semblables à la réaction de défense et donc à la stimulation du DMH (Comet et al. 2005; Carrive et al. 1987; Nosaka et al. 1993; Hamalainen and Lovick 1997).

L'augmentation de la PA et la tachycardie observées pendant la réaction de défense est en grande partie due à la mise en jeu de l'activation de neurones sympatho-excitateurs de la RVL (Carrive et al. 1987; Lovick 1992; Lumb and Lovick 1993). En effet, le DMH et la dIPAG projettent directement et de façon bilatérale dans la RVL (Fontes et al. 2001; Wang et al.

2010) et plusieurs neurotransmetteurs excitateurs semblent être mis en jeu dans cet effet, dont le glutamate et l'orexine (Machado et al. 2002; Huang et al. 2010; Shahid et al. 2012). De plus, les cellules sympathoexcitatrices de la RVL se trouvent dans la même région que les neurones respiratoires du GRV (voir chapitre I, paragraphe II)B)) et l'activation du DMH et de la dlPAG produisent des réponses hyperventilatoires qui font intervenir ces neurones (Tolentino-Silva et al. 2000; Subramanian and Holstege 2009). Cependant il faut noter que les voies qui partent du DMH et de la dlPAG et qui se dirigent vers la RVL semblent être distinctes car le blocage de la dlPAG ne modifie pas les réponses cardiorespiratoires induites par le DMH et inversement (Sévoz-Couche et al. 2003; Netzer et al. 2011).

D'autre part, la réaction de défense module la réponse cardiaque parasympathique du baroréflexe (et du chémoréflexe carotidien). En effet, l'augmentation de la PA induite lors de cette réponse au stress pourrait induire le baroréflexe. Or le ralentissement cardiaque dû à ce réflexe pourrait s'opposer à l'augmentation du débit cardiaque nécessaire à la mise en action de l'organisme pour réagir face au stress. Ainsi, l'activation du DMH induit une inhibition de la réponse cardiaque du baroréflexe et du chémoréflexe carotidien. Cette inhibition passe par une voie indirecte impliquant le noyau cunéiforme (CnF) puis la dlPAG et le RMg avant d'agir sur les centres bulbaires impliqués dans le contrôle réflexe tel que le NTS (Netzer et al. 2011). Cette inhibition passerait par l'activation de récepteurs GABA<sub>A</sub> localisés dans ce noyau activés par les récepteurs 5-HT<sub>3</sub> (Sévoz-Couche et al. 2003), comme nous l'avons mentionné précédemment dans le Chapitre I, paragraphe I)C)1)(i)(d). La sérotonine libérée dans le NTS lors de la réaction de défense proviendrait probablement du RMg et du LPGi (groupe B3, voir Chapitre I, paragraphe I)C)1)(i)(d) (Bernard et al. 2008).

Il est à noter que i) même si l'activation des récepteurs 5-HT<sub>3</sub> du NTS induit une élévation de la PA, le blocage de ces récepteurs ne prévient pas l'hypertension induite par la réaction de défense, et ii) la composante sympathique du baroréflexe n'est pas inhibée lors de la réaction de défense. Ces deux circuits ne semblent donc pas être impliqués pour expliquer, même en partie, l'hyperactivité sympathique caractéristique du stress (Sévoz-Couche et al. 2003; Netzer et al. 2009).

**Les recherches qui ont été au centre de cette thèse ont donc porté particulièrement sur l'identification des circuits neuronaux impliqués dans les modifications cardiorespiratoires impliqués par le stress chronique, et une attention particulière a été portée sur le DMH, la RVL et le NTS. Le modèle utilisé chez le rat a été celui de la**

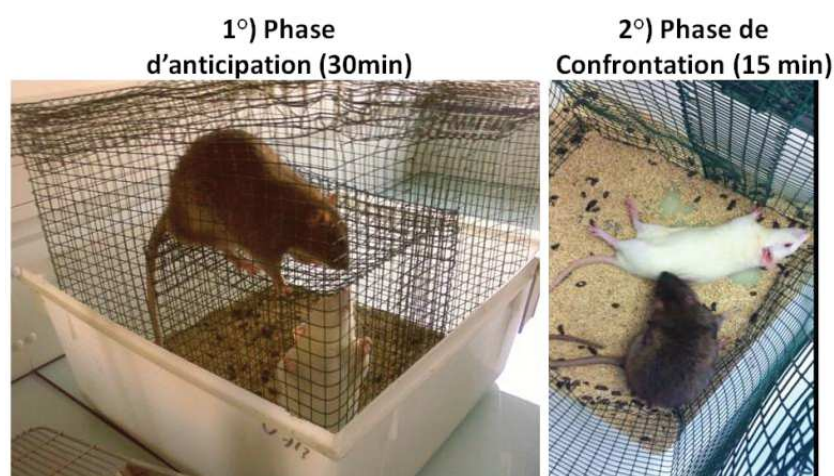
défaite sociale (procédure de 4 jours induisant un profil anxieux) et quelques expériences ont aussi été réalisées chez la souris, avec un modèle de défaite élaboré sur 10 jours et induisant un profil de dépression.

## **MATERIEL ET METHODES**

## I) Procédures générales du stress et d'évaluation du stress

### A) Défaite sociale chez le rat

Nous avons utilisé un protocole de défaite sociale (DS) développé et validé récemment (Andre et al. 2005; Becker et al. 2001; Becker et al. 2008). **Il consiste à soumettre un rat intrus, Sprague-Dawley, à un rat résident et agressif, Groningen, durant 4 jours, à raison d'une session quotidienne de 45 minutes. La session se divise en deux phases (Figure 15).** Lors de la première phase de 30 minutes, les animaux sont séparés l'un de l'autre par un grillage, empêchant tout contact physique mais permettant néanmoins des contacts olfactifs, visuels et auditifs, c'est la phase d'anticipation. Puis, lors de la seconde phase de 15 minutes, le grillage est retiré, autorisant ainsi des confrontations physiques entre les deux animaux, au cours desquelles le rat intrus est toujours dominé par le rat résident. Ces épisodes de confrontation sont au nombre de 2 à 4 par session et durent environ 10 secondes. Quatre jours de DS induisent chez le rat Sprague-Dawley, 5 jours après le terme du protocole, une hyperactivité de l'axe HHS, caractérisée par des taux plasmatiques de corticostérone augmentés de 600 % et un poids des glandes surrénales accru de 30 %, une diminution de la consommation d'eau sucrée, reflet de l'anhédonie, ainsi qu'une perte de poids (Andre et al. 2005; Becker et al. 2008). Un profil anxieux apparaît 5 jours après la dernière confrontation (Rivat et al. 2010). Au cours de cette étude, nous avons enrichi le phénotype de ces animaux en y ajoutant des paramètres comportementaux (test du Plus Maze), et biologiques (mesure des taux de BDNF dans la RVL et le NTS). Ces tests et la mesure des paramètres cardiorespiratoires ont été réalisés à différents stades post-DS.



**Figure 15 : Défaite sociale chez le rat**

## B) Défaite sociale chez la souris

**Des souris mâles adultes C57BL/6J (âgées de 8 semaines) ont subi un protocole de défaite sociale s'étalant sur 10 jours.** Quotidiennement, chaque souris C57BL/6J a été introduite dans une cage d'une souris mâle CD1 (ancien reproducteur) pendant 10 minutes. Les souris agressives CD1 ont été sélectionnées au préalable par un test de screening durant 3 jours où seuls les CD1 ayant une latence d'attaque inférieure à 2 minutes sur 2 jours consécutifs ont été sélectionnés. Suite aux 10 minutes de confrontation, les résidents et intrus ont été maintenus dans la même cage pendant 24h séparés par un plexiglas troué séparant la cage en deux compartiments et permettant uniquement des contacts sensoriels (anticipation prolongée). Chaque jour, les souris intruses C57BL/6J ont rencontré un agresseur différent. Les souris C57BL/6J servant de contrôle ont été logées par paires dans une cage et séparées également par un plexiglas troué. Ces souris n'ont pas été manipulées pendant les 10 jours de défaite.

## C) Modifications de paramètres comportementaux et biologiques par la défaite sociale

### 1) Evaluation chez le rat Sprague-Dawley

- Suivi de la courbe de poids : à partir de l'isolement et jusqu'à la fin du protocole, tous les rats ont été pesés quotidiennement à la même heure. **Une diminution de la prise de poids est associée à un profil stressé** (Becker et al. 2001; Becker et al. 2008).
- L'activité de l'axe HHS : Les glandes surrénales ont été prélevées et dégraissées une fois toutes les expériences achevées. Le poids des glandes est rapporté au poids de l'animal (mg/100g de masse corporelle). **Une augmentation du poids de ces glandes rend compte d'une hyperactivité durable de l'axe HHS** (Andre et al. 2005; Becker et al. 2001; Becker et al. 2008). Du fait de l'anesthésie prodiguée à l'animal en fin de protocole, le dosage de corticostérone n'a pu être effectué dans cette étude. Les expériences précédentes effectuées au laboratoire avec ce même protocole a cependant montré que le taux de ce glucocorticoïde chez les rats ayant subi la DS était augmenté de 6 à 7 fois par rapport aux rats témoins, cinq jours après la dernière confrontation (Becker et al. 2008).
- Le test du labyrinthe en croix surélevé (« Elevated Plus Maze ») a été réalisé 5 jours ou 25 jours (selon l'étude) après la dernière confrontation chez les rats qui ont été soumis au stress. Le labyrinthe est constitué de 2 bras ouverts et de 2 bras fermés reliés par une plateforme centrale. L'ensemble du dispositif est surélevé à 50 cm du sol, et légèrement éclairé.

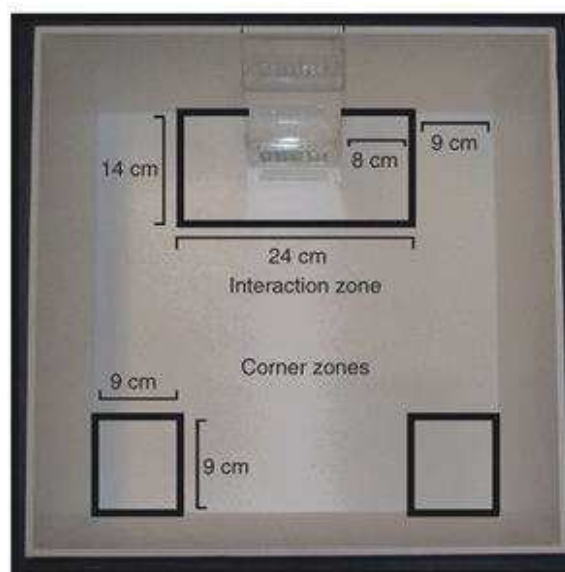
Les tests ont été réalisés entre 9 h et 13 h. Au début de chaque test, le rat a été placé au milieu de la plateforme, face à l'un des deux bras ouverts. Une caméra placée au-dessus du labyrinthe couplée à un logiciel d'analyse permet de comptabiliser le temps passé dans chacun des bras. **Les rats présentant un profil anxieux passent moins de temps dans les bras ouverts que les rats contrôles** (Becker et al. 2008).

## 2) Evaluation chez la souris C57BL/6J :

- Tout comme chez le rat, le suivi du poids corporel et l'activité de l'axe HHS ont été évalués chez la souris. Cependant, les souris ont été pesées seulement au premier jour de défaite (avant toute confrontation) et au lendemain du 10ème jour de stress.
- Open Field : Les souris ont été testées dans l'Open Field 24h après le dernier jour de défaite. Un système de videotracking (Viewpoint, France) a été utilisé pour suivre le mouvement des souris dans une enceinte de plexiglas fermée (50 x 50 x 45 cm). Les animaux ont été placés dans un angle de l'Open Field puis laissées libres de l'explorer. La distance totale parcourue dans l'open field ainsi que le nombre d'entrées et le temps total passé au centre de cet Open Field (carré de 20 x 20 cm) ont été mesurés pendant 1 heure. **Les animaux ayant un profil anxieux passent moins de temps à explorer l'Open Field** (Tuma et al. 2015).
- Interaction sociale chez la souris: le test d'interaction sociale s'est déroulé dans l'Open Field. A la suite du test de l'Open Field, qui aura servi de phase d'habituation et d'exploration du milieu pour les souris C57BL/6J, un test d'interaction sociale a été réalisé. Une petite cage a été placée dans le milieu d'un côté de l'Open Field (Figure 16). Les souris C57BL/6J ont été introduites dans l'Open Field pendant 2min30 sans agresseur dans la cage. Puis la souris a été retirée de l'Open Field le temps de placer un agresseur CD1 non-familier dans la cage. La souris C57BL/6J a ensuite été remise dans l'Open Field pendant 2min30. Une zone d'interaction a été définie autour de la cage de l'agresseur CD1 (Figure 16). Un système de videotracking (Viewpoint, France) a été utilisé pour suivre le mouvement des souris dans l'Open Field. Les animaux ont été placés dans un angle de l'open field et laissés libres de l'explorer lors de la phase d'habituation et lors de la phase de test. L'indice d'interaction sociale mesuré est calculé de cette façon :

$$\frac{\text{Temps passé dans la zone d'interaction avec l'agresseur}}{\text{Temps passé dans la zone d'interaction sans agresseur}} \times 100$$





**Figure 16 : Test d'interaction sociale**

**Les souris C57BL/6J ayant un profil dépressif passent moins de temps à interagir avec l'agresseur CD1 (Šlamberová et al. 2015)**

## **II) Enregistrements des paramètres cardiorespiratoires**

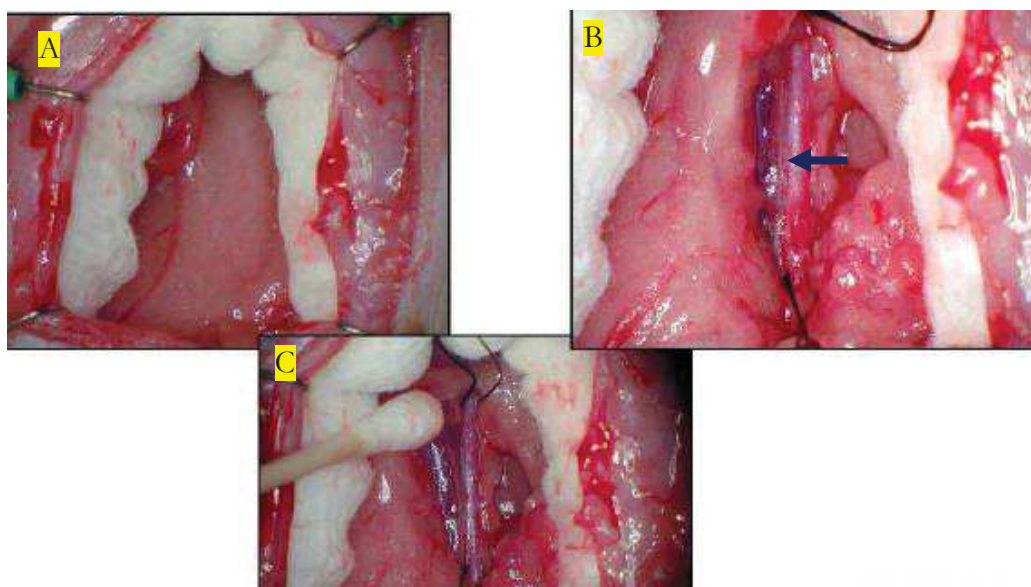
### **A) Techniques chirurgicales pour les enregistrements des paramètres cardiovasculaires sur rats anesthésiés : canulations et électrocardiogramme**

Les animaux ont été anesthésiés avec du pentobarbital sodique (60 mg/kg, i.p., Ceva santé animale), avec la température corporelle maintenue à 37°C par un matelas chauffant. Deux cathéters en polyéthylène, contenant du sérum physiologique hépariné (10 UI/ml), ont été introduits respectivement dans la veine fémorale pour l'administration de drogues et dans l'artère fémorale pour l'enregistrement de la PA (systolique, diastolique et moyenne) et la FC. Le cathéter artériel est relié via un capteur de pression à une interface (1401 plus, CED), dont les données sont traitées par le logiciel Spike 2 (CED, Cambridge, UK). Trois électrodes en acier placées l'une dans une patte antérieure, l'autre dans une patte postérieure et la troisième (masse) au niveau d'une épaule de l'animal, ont permis l'enregistrement de l'électrocardiogramme (ECG) par l'amplification des signaux (Amplificateur Universel

GOULD). La FC instantanée est automatiquement obtenue à partir de l'onde QRT et exprimée en battement par minute.

### **B) Techniques chirurgicales pour les enregistrements des paramètres cardiovasculaires sur rats éveillés: enregistrements téléométriques**

Des rats Sprague Dawley ont subi l'implantation de capteurs radiotéléométriques (C50PXT) 2 semaines avant le protocole de défaite sociale (Data Sciences International, St. Paul, MN, USA). L'opération a été réalisée sous asepsie et sous anesthésique (Isoflurane 2%). Les rats ont également été prétraités avec un analgésique (Xylocaïne, 5 mg/kg, s.c.), et un anti-inflammatoire (Métacam, 1 mg/kg, s.c.) et ont aussi reçu un traitement antibiotique (Pénicilline, 0.3 ml, i.p.) à la fin de l'opération chirurgicale. Les capteurs ont été implantés dans la cavité péritonéale. Pour cela, une incision de la peau et de la paroi abdominale ont été faite. Puis, après rétractation des viscères par du coton (Figure 17A), l'aorte abdominale a été identifiée (Figure 17B, flèche). Un fil permettant la ligature temporaire a été placé sous l'artère rénale (Figure 17B), et un trou fait par une aiguille (Gauge 25) au niveau de la bifurcation des artères iliaques (Figure 17C, flèche) a permis l'insertion du cathéter dans l'aorte abdominale (cathéter enfoncé vers le haut). Ce cathéter étant de diamètre très inférieur à celui de l'aorte, la circulation n'est alors pas perturbée par cette insertion. La ligature supérieure a ensuite été enlevée et a permis de retrouver une circulation sanguine normale.



**Figure 17 : photo de la procédure chirurgicale pour placer le cathéter de l'implant téléométrique dans l'aorte abdominale**

Le cathéter introduit dans l'aorte abdominale a permis l'enregistrement de la PA (systolique, diastolique et moyenne) et la FC. Pour les enregistrements de biopotentiels (ECG), les électrodes ont été tunnelées de façon sous cutanée et avancées au niveau de la cage thoracique. L'électrode positive a été placée au niveau de l'appendice xiphoïde et l'électrode négative a été introduite entre les muscles sternomastoïdien et sterno-hyoïdien afin de la placer le long de la trachée à l'intérieur de la cage thoracique (Sgoifo et al. 1996). Les sutures ont été fermées grâce à des fils non absorbables (fixation des implants sur la paroi abdominale) et des agrafes (peau). Les enregistrements ont été réalisés tous les après-midi (entre 13h et 18h), pendant la phase de repos des animaux. Les enregistrements ont débuté 3 jours avant la défaite sociale (D-3) et jusqu'à la fin du protocole, soit D30. L'acquisition des enregistrements a été faite par le logiciel Dataquest A.R.T. 3.1 Gold software (Data Sciences).

### **C) Techniques chirurgicales pour l'enregistrement de la respiration chez le rat anesthésié et éveillé**

Dans certaines expériences, des rats anesthésiés en fin de protocole ont été trachéotomisés pour enregistrer la fréquence respiratoire. La canule insérée dans la trachée a été reliée à un pneumotachographe (Fleisch 0000) lui-même relié à un capteur de pression. La mesure du cycle respiratoire a été enregistrée sur le logiciel Spike2, en parallèle de l'ECG.

De plus, quelques rats ont été implantés avec les capteurs télémétriques pour mesurer le cycle respiratoire et l'ECG. Le principe chirurgical est le même que décrit précédemment mais le cathéter de pression a été placé sous la couche séreuse de l'œsophage et avancée dans la cavité thoracique, juste après la jonction avec le diaphragme (Murphy et al. 2001). Ceci a permis d'enregistrer la pression sous-pleurale, grâce aux mouvements thoraciques et au niveau subpleural.

Ceci a permis de vérifier la corrélation entre la fréquence respiratoire et le pic ASR afin d'obtenir la fréquence respiratoire à partir des enregistrements des ECG en télémétrie et en anesthésie tout en gardant la mesure de la PA.

### III) Evaluation des paramètres cardiorespiratoires

#### A) Mesure de la VFC

L'analyse de la VFC sur animaux anesthésiés ou conscients s'est effectuée grâce au logiciel Spike 2 (CED, version 6.0) à partir du calcul de l'intervalle entre chaque pic R (intervalle RR) de l'onde QRS, observée à partir de l'ECG (moyenne de 3 segments de 2 minutes chacun). La VFC donnée par l'analyse de l'intervalle RR peut être temporelle. Ainsi, nous avons analysé les deux paramètres les plus fréquemment calculés : **la SDNN** (moyenne des écart-types de tous les intervalles R-R ou racine carrée de la variance de distribution), **et la rMSSD** (Racine carrée de la moyenne des différences au carré entre les intervalles R-R successifs).

L'analyse fréquentielle de la VFC (par l'aire sous la courbe de la densité spectrale de l'intervalle RR), utilise la transformée de Fourier (FFT 256 chez le rongeur). Cette analyse fréquentielle permet de visualiser 2 bandes majeures de fréquence pour l'analyse de la balance sympathovagale: une de basse fréquence (LF, 0,2-0,7 Hz chez le rat ; 0,2-1,0 Hz chez la souris) et une de haute fréquence (HF, 0,7-2 Hz chez le rat ; 1,0-5,0 Hz chez la souris). Nous avons particulièrement tourné notre attention sur le ratio LF/HF et le LF normalisé ( $LF_{nu} = LF / (LF + HF)$ ), indicateurs de l'activité sympathique, et sur la bande HF et HF normalisée ( $HF_{nu} = HF / (LF + HF)$ ), indicateurs du tonus vagal (Pagani et al. 1986).

Comme je l'ai mentionné ci-dessus (chapitre I paragraphe IC)2), la bande HF déterminée par l'analyse spectrale de la VFC est le reflet de l'impact du cycle respiratoire sur la FC. Cette bande est également appelée arythmie sinusale respiratoire (ASR) car elle reflète l'augmentation de la FC lors de l'inspiration, et sa diminution lors de l'expiration. Il est admis que la fréquence du pic observé dans la bande HF (pic de l'ASR) correspond à chaque inspiration, et donc reflète la fréquence respiratoire (Eckberg 2003). Nous avons donc déterminé la variation de ce pic en continu (jusqu'à DS+30), par l'analyse spectrale de l'intervalle RR obtenu par enregistrements télémétriques (voir ci-dessus), pour déterminer la variation de la fréquence respiratoire induite par le stress chronique.

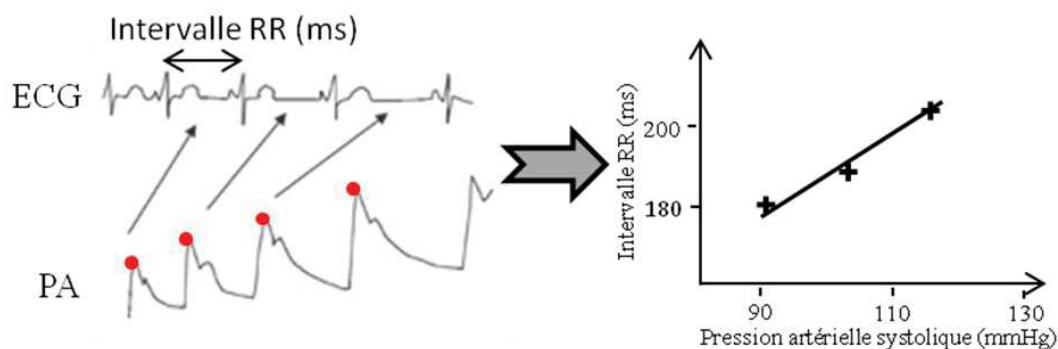
Le VFC est mesurée sur les rats et souris anesthésiés à la fin des différents protocoles. Pour les rats, la VFC a été mesurée avant et après les microinjections dans le DMH et le NTS (moyenne de 3 segments de 5 minutes).

Egalement, la VFC est analysée sur les enregistrements télémétriques sur 4 segments de 2 minutes par jour et par rat. Ces 4 segments sont sélectionnés en fonction de l'activité

locomotrice qui doit être modérée. L'analyse de la VFC se fait également sous Spike CED (version 6.0) après importation depuis Dataquest.

### B) Mesure du baroréflexe

Le baroréflexe a été analysé de deux façons différentes. D'une part, le baroréflexe spontané a été déterminé en utilisant la méthode des séquences (Laude et al. 2004). Pour cela, les séquences de trois valeurs successives croissantes de PA systoliques associées à trois valeurs croissantes d'intervalles RR correspondantes sont établies (Figure 18). La sensibilité du baroréflexe spontanée est calculée à partir de la moyenne des pentes de chaque séquence. Le baroréflexe spontané a donc pu être mesuré à partir des enregistrements sous anesthésie et en télémétrie. Les segments analysés sont strictement les mêmes que pour l'analyse de la VFC.



**Figure 18 :** Analyse du baroréflexe spontanée par la méthode des séquences

D'autre part, sur les animaux anesthésiés, l'activation du baroréflexe peut aussi être induite pharmacologiquement par l'administration intraveineuse de nitroprussiate sodique (SNP, 100 µg/kg, i.v.) suivie de phényléphrine (PE, 10 µg/kg). Le SNP est un vasodilatateur à action très rapide, et induit donc une diminution de la PA. Cela met au silence les barorécepteurs et la FC monte. Au plateau, la PE, en provoquant au contraire une élévation importante de la PA, engendre une réponse baroréflexe cardiaque sous la forme d'une diminution de la FC (bradycardie). La réponse cardiaque du baroréflexe (BRR) est mesurée par la formule suivante :  $(\Delta FC / FC_{\text{baseline}}) / \Delta PA$ . Le logiciel PRISM (GraphPad Prism version 5.00, San Diego California USA) permet la création d'une courbe sigmoïde, selon l'équation de Boltzmann:

$$Y = \text{Bottom} + (\text{Top} - \text{Bottom}) / (1 + \exp((V50 - X) / \text{Slope}))$$

Une régression linéaire de la partie rectiligne de cette courbe permet de déterminer la sensibilité du baroréflexe pharmacologique

## IV) Traitement pharmacologique aigu et chronique

### A) Traitements et microinjections aiguës et locales dans le DMH et le NTS sous anesthésie

Lorsque les rats anesthésiés ont été canulés, ils ont été placés sur un appareil stéréotaxique (KOPF) avec la tête maintenue en position horizontale. Les coordonnées spatiales sont repérées par rapport au point bregma (intersection des sutures longitudinale et transversale des os crâniens) : chez le rat- DMH= 3mm en arrière de bregma ; latéral : 0.5mm de la ligne médiane ; profondeur : 8mm ; NTS = -14.4mm en arrière de bregma ; latéral : 0.5mm de la ligne médiane ; profondeur : 0.5mm. Les microinjections (0.1  $\mu$ l, 1 sec.) ont été réalisées à l'aide de micropipettes en verre de diamètre inférieur à 100 $\mu$ m, reliées à une seringue Hamilton de 1 $\mu$ l. Afin d'inhiber le DMH, du muscimol (5mM), agoniste des récepteurs GABA<sub>A</sub> (Stotz-Potter et al. 1996), a été injecté dans la structure. Le blocage des récepteurs 5-HT<sub>3</sub> du NTS a été réalisé en micro-injectant de façon bilatérale un antagoniste spécifique, le granisetron (250 pmol) directement dans la structure (Hoyer et al. 2002). Dans la RVL, la microinjection bilatérale de losartan (5 mM), a permis de bloquer sélectivement les récepteurs à l'angiotensine II, AT<sub>1</sub>. Une injection intra-veineuse de granisetron a été réalisée chez les rats anesthésiés (0,1mL, 10  $\mu$ g/kg).

Chez les animaux contrôles, de la solution physiologique a été injectée à la place des substances actives. Les analyses de la VFC et de la fonctionnalité du baroréflexe (spontané et pharmacologique) sont effectuées chez ces animaux 5 min après l'injection.

### B) Traitement pharmacologique chronique

*Sans traitement* : les rats n'ayant reçu aucun traitement ont été appelés "naïfs".

*Traitement anxiolytique* : juste après la dernière confrontation (D4), une pompe ALZET (2ML1 ; Charles River ; L'Arbresle, France), a été implantée dans le dos des rats témoins et stressés. Pour cela l'opération a été réalisée sous légère anesthésie volatile (Isoflurane 2%). Les rats ont également été prétraités avec un analgésique (Xylocaïne, 5 mg/kg, s.c.), et un anti-inflammatoire (Métacam, 1 mg/kg, s.c.) et ont reçu un traitement antibiotique (Pénicilline, 0.3 ml, i.p.) à la fin de l'opération chirurgicale. Pour le placement des pompes, une petite incision a été faite sur la peau du dos, au niveau des omoplates. Puis, une poche a été réalisée en écartant les tissus sous-cutanés, pour permettre le placement de la pompe. La peau a été refermée par des agrafes.

Les pompes contenaient soit une solution physiologique, soit de la chlordiazépoxide (CDZ; 10mg/kg/jour), anxiolytique de la famille des benzodiazépines (López-Muñoz et al. 2011). Les animaux ont donc reçu ce traitement jusqu'à l'analyse des paramètres cardiorespiratoires à la fin du protocole (D10).

*Traitement au losartan (antagoniste des récepteurs  $AT_1$  de l'angiotensine II) :*

Une cohorte de rats implantés avec des capteurs radiotélémetriques a reçu un traitement chronique au losartan dès la fin de la défaite sociale et pendant 15 jours. Pour cela, comme décrit ci-dessus, des pompes ALZET 2ML1 contenant une solution de losartan (0.69mg/kg/jour), ont été implantées dans le dos des rats témoins et stressés.

## V) Dosage

### A) Dosage protéique du BDNF : méthode ELISA

Un dosage par la méthode ELISA a été utilisé pour quantifier le BDNF protéique totale dans le sang, la RVL et le NTS des rats.

*Prélèvement du sérum :* L'animal a été maintenu pour un prélèvement dans la queue (veine latérale), à l'aide d'une aiguille Terumo relié à un tubage plastique. Les prélèvements (200  $\mu$ l) ont ensuite été transférés dans des tubes Eppendorf, et conservés à -20°C. Ces prélèvements ont eu lieu avant (D-3), et après (D10 et D30) la procédure de stress.

*Extraction protéique dans la RVL et NTS :* A la fin de différents protocoles (D10 ou D30), les RVL et le NTS des rats ont été prélevés rapidement après le sacrifice (prélèvements bilatéral) et conservés à -80°C. Au moment du prélèvement, les structures ont été pesées. Le BDNF a été extrait comme décrit par Szapacs (Szapacs et al. 2004). Pour ces deux structures, 450 $\mu$ L de tampon de lyse (100 mM PIPES, 500 mM NaCl, 0.2% Triton X-100, 0.1% NaN<sub>3</sub>, 2% BSA, and 2 mM EDTA) contenant des inhibiteurs de protéases (200M MSF, 0.3M aprotinin, and 10M leupeptin), ont été ajouté à chaque échantillon. Ensuite, les tissus ont été broyés par sonication (pulses brefs d'1 sec pendant 15 secondes). Les échantillons ont ensuite été centrifugés à 16000 g pendant 30 minutes à 4°C, et le surnageant a été récupéré et congelé à -20°C.

Pour le dosage du BDNF dans le sérum et dans ces deux structures, la méthode ELISA a été utilisée. Les échantillons sérique ont été dilués au 1/25<sup>ème</sup> et les tissus extraits au 1/10<sup>ème</sup> avec



le kit de dosage du BDNF fourni par Proméga (BDNF Emax® ImmunoAssay System). Les échantillons ont été dosés en duplicata dans des plaques de 96 puits contenant une gamme d'étalonnage.

## B) qRT-PCR

Une quantification des ARNm du BDNF, de l'angiotensinogène, des récepteurs 5-HT<sub>3A</sub> et des récepteurs de l'angiotensine II a aussi été effectuée chez la souris. L'ARNm total a été extrait du NTS, de la RVL et du DMH suivant le protocole d'extraction Ambion<sup>TM</sup> (KIT TRI Reagent Solution). Un protocole de qRT-PCR (SYBRGreen) a ensuite été appliqué pour ces dosages. Le gène de référence utilisé est l'ACTB (Actin beta, cytoplasmic 1). Les différents primers utilisés sont référencés dans le tableau ci-dessous.

**Tableau 2 : Liste des Primer utilisés pour la qRT-PCR**

ARNm	Forward primer	Reverse primer
5-HT <sub>3A</sub>	5' GTGGACTCCTGAGGACTTCGACAA 3'	5' AGATGTCAAGGCTACAGGCGGTCA 3'
BDNF 9	5' AAAACCATAAGGACGCGGAC 3'	5' TAGACATGTTTGCGGCATCC
BDNF 4	5' CTCTGCCTAGATCAAATGGAGCT 3'	5' GAAGTGACAAAGTCCGCGTCCTT 3'
BDNF 6	5' GCTGGCTGTGCGACGGTCCCAT 3'	5' GAAGTGACAAAGTCCGCGTCCTT 3'
ACTB	5' CCACCATGTACCCAGGCATT 3'	5' CGGACTCATCGTACTCCTGC 3'

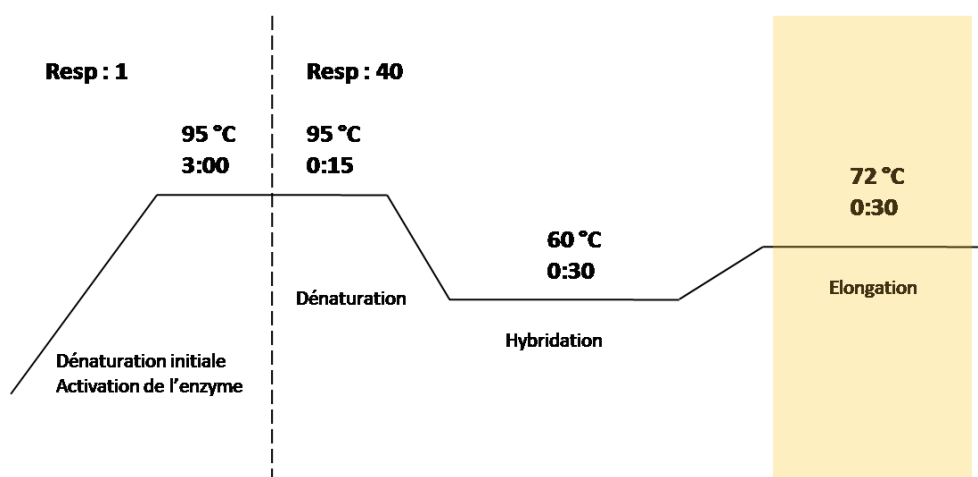
1°) Extraction des ARNm : les tissus prélevés chez les souris 2 jours après la fin de la défaite sociale (NTS, RVL et DMH) ont été broyés dans 500µl de formol (Ambion<sup>TM</sup>, KIT TRI Reagent Solution) à l'aide d'un piston. Après ajout de chloroforme et application des centrifugations, nous avons obtenu 3 phases : phase aqueuse transparente (ARN), interphase blanche (ADN) et phase organique rose (protéines). La phase aqueuse contenant les ARN a ensuite été transférée dans un nouveau tube Ependorff. De l'isopropanol y a été ajouté et après centrifugation, le surnageant a été jeté. Le culot a été dissout dans de l'éthanol à 75%. Suite à une nouvelle centrifugation, le surnageant a été jeté et le culot a été dissout dans 30µl d'eau milliQ. Une évaluation de la quantité total d'ARN a été réalisée grâce à un Nanodrope, avant de congeler les échantillons à -80°C.

2°) Réaction de Transcription Inverse (RT) : avant de réaliser la PCR, les ARN de chaque échantillon ont été transcrits en ADN complémentaire (ADNc). Le volume final par tube



d'échantillons de la réaction de RT doit être de 20  $\mu\text{L}$ , avec 14  $\mu\text{L}$  d'ARN (contenant 500 ng d'ARN) dilué dans eau milliQ et 6  $\mu\text{L}$  de mix PCR. Le mix PCR contient 2  $\mu\text{L}$  de RT Buffer, 0.8  $\mu\text{L}$  de dNTP, 2  $\mu\text{L}$  de RT Random, 1  $\mu\text{L}$  de RT multiscribe et 0.2  $\mu\text{L}$  d'eau milliQ. Ces tubes ont ensuite été installés dans un thermomixeur et ont entamé le cycle de température suivant : 10 minutes à 25°C, 2 heures à 37°C et 5 secondes à 85°C. Tout de suite après le dernier palier de température, les échantillons ont été plongés dans la glace pour arrêter la réaction. 80  $\mu\text{L}$  d'eau milliQ ont ensuite été ajoutés par tube pour avoir un volume final de 100  $\mu\text{L}$  par tube.

3°) Réaction de PCR (Figure 19): La PCR a été réalisée dans des plaques de 96 puits. Chaque gène testé sur chaque échantillon a été réalisé en triplicata. Le gène de ménage utilisé a été l'ACTB. 5  $\mu\text{L}$  d'ADNc des échantillons a été introduit dans chaque puits contenant 15  $\mu\text{L}$  de mix PCR (eau milliQ : 3.8  $\mu\text{L}$  ; SYBR Green : 10  $\mu\text{L}$  ; Primers à 10  $\mu\text{M}$  : 0.6  $\mu\text{L}$ ).



**Figure 19 :** Représentation d'un cycle de PCR avec les différentes étapes

## VI) Histologie

Du bleu de méthylène, qui n'altère pas les paramètres cardiovasculaires par lui-même (Sévoz-Couche et al. 2003), a été ajouté aux substances microinjectées. A la fin du protocole, les rats ont été perfusés de façon intracardiaque avec une solution d'eau physiologique suivie d'une solution de paraformaldéhyde à 4% tamponnée par du phosphate de sodium 0.1M pour obtenir un pH proche de 7,4. Le cerveau fixé a ensuite été prélevé et conservé dans une

solution de sucre 20% pendant 48h. Puis, des coupes histologiques de 70  $\mu\text{m}$  d'épaisseur sont réalisées à l'aide d'un vibratome. Ces coupes sont ensuite colorées à la thionine.

## **VII) Analyses statistiques**

Toutes les valeurs ont été exprimées en moyenne  $\pm$  SEM (Erreur standard). Les modifications comportementales, physiologiques et cardiovasculaires entre les témoins et les stressés ont été analysées par un test de Student impair pour 2 groupes, et par un test one-way ANOVA lorsque plusieurs groupes devaient être comparés entre eux. Un test two-way ANOVA a été utilisé pour comparer les effets sur ces paramètres du traitement anxiolytique, de l'injection de muscimol dans le DMH, de l'injection de granisetron dans le NTS chez les rats stressés et témoins. Un test two-way ANOVA en mesures répétées a été réalisé pour comparer la prise de poids et l'ensemble des paramètres cardiorespiratoires obtenus en télémétrie des rats stressés et témoins tout au long du protocole. Les résultats ont été considérés comme significatifs à  $p < 0.05$ , et suivis par un test *post-hoc* de Bonferroni quand nécessaire. Les analyses ont été faites avec le logiciel Prism 5.04 (Graph Pad Software).

## **RESULTATS**

## **Etude I :**

### **Implication du DMH et des récepteurs 5-HT<sub>3</sub> du NTS dans les modifications cardiovasculaires induites par un stress chronique**

#### **Article n°1**

**Involvement of the dorsomedial hypothalamus and the nucleus tractus solitarii in chronic cardiovascular changes associated with anxiety in rats**

Sévoz-Couche C, Brouillard C, Camus F, Laude D, De Boer SF, Becker C and Benoliel JJ.

J Physiol., 591(Pt 7):1871-87, 2013

#### **Article n°2**

**Long-lasting increase in sympathetic activity and BDNF upregulation induced by repeated social defeat**

Charly Brouillard, Pascal Carrive, Françoise Camus, Jean-Jacques Bénoliel, and Caroline Sévoz-Couche

#### **Résultats complémentaires**

## INTRODUCTION

Dans les rappels bibliographiques, nous avons résumé l'impact néfaste d'un stress chronique sur le système cardiovasculaire, incluant des pathologies graves ou simplement des modifications de la VFC et de la sensibilité du baroréflexe, indice de risque accru de survenue d'évènements cardiovasculaires. A la suite de nombreuses études sur le stress aigu, le DMH a été présenté comme une structure centrale clé impliquée dans ces modifications autonomiques et cardiovasculaires (Voir Chapitre II, paragraphe III)D)). En effet, son activation induit une augmentation de la FC et de la PA ainsi qu'une inhibition de la composante cardio-vagale du baroréflexe (DiMicco et al. 2002; Gebber et Snyder 1970; Hockman et Talesnik 1971; Coote et al. 1979; Zhang et al., 2006). De plus, toutes ces modifications induites par un stress aigu n'apparaissent plus lorsque le DMH est préalablement inhibé.

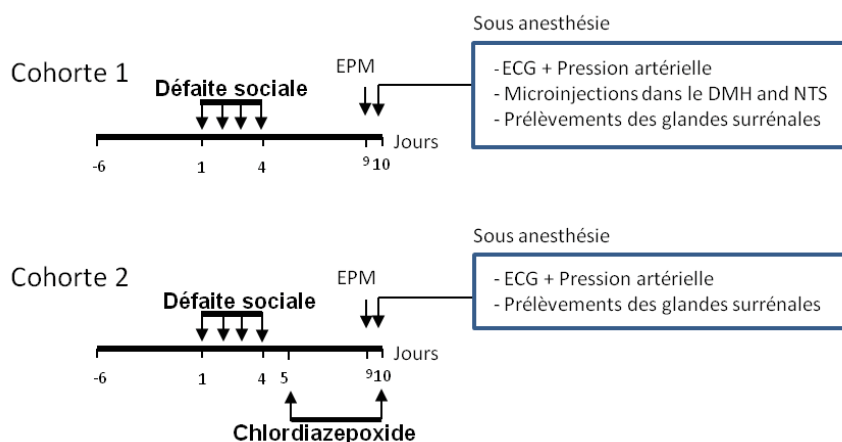
Nous avons également détaillé la modulation du baroréflexe par l'action de la sérotonine au niveau du baroréflexe et les résultats antérieurs obtenus dans notre laboratoire révèlent qu'au niveau du NTS, la sérotonine, par action spécifique sur les récepteurs 5-HT<sub>3</sub>, est à l'origine de l'inhibition de la composante cardio-vagale du baroréflexe en condition de stress aigu (Sévoz-Couche et al. 2003).

**Par conséquent, le premier objectif de ma thèse était de voir si ces mêmes mécanismes étaient impliqués en condition de stress chronique et notamment dans un modèle induisant un phénotype de type anxieux.**

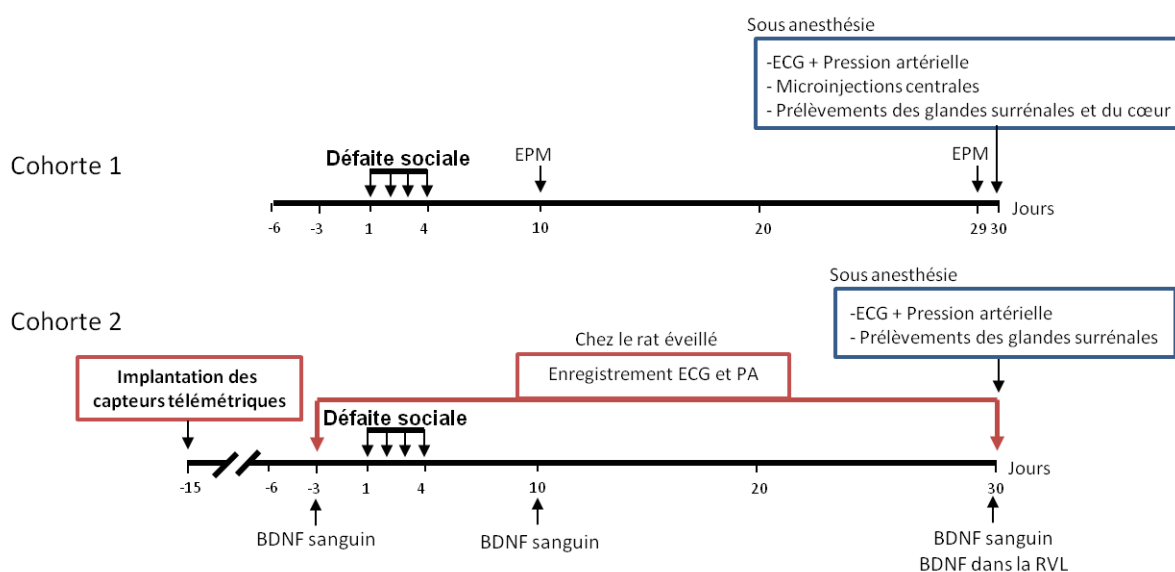
Afin de répondre à cette question, nous nous sommes basés sur un modèle de défaite sociale et validé comme induisant un profil de type anxieux chez le rat (Voir Matériel & Méthodes III)A) ). Nous avons dans un premier temps observé les modifications cardiovasculaires à court terme et à long terme, respectivement lorsque les rats présentaient un phénotype de type anxieux (D10, Figure 20 Cohorte 1) ou lorsque qu'il avait disparu (D30, Figure 21 Cohorte 1). Egalement, une analyse quotidienne des paramètres cardiovasculaires a été réalisée sur les rats éveillés grâce à l'implantation préalable de capteurs télémétriques mesurant la PA et l'ECG (Voir Matériel & Méthodes II)B) Figure 21 cohorte 2). Afin de conforter l'implication de l'anxiété sur ces altérations physiologiques, un traitement anxiolytique a été appliqué sur certains rats et les effets ont été observés à 5 jours après la fin de défaite sociale (D10) (Figure 20 Cohorte 2).

Enfin, nous avons analysé les effets de microinjections soit de muscimol (agoniste GABAergique) dans le DMH, soit de granisetron (antagonistes des récepteurs 5-HT<sub>3</sub>) dans le

NTS sur ces modifications cardiovasculaires apparues sur les rats stressés sous anesthésie à D10 et D30.



**Figure 20:** Protocole de l'Article 1. Analyse à court terme (D10) des paramètres cardiovasculaires sous anesthésie



**Figure 21 :** Protocole de l'Article 2. Analyse à long terme (D30) des paramètres cardiovasculaires sous anesthésie et en télémétrie

**Article n°1****Involvement of the dorsomedial hypothalamus and the nucleus tractus solitarii in chronic cardiovascular changes associated with anxiety in rats**

Sévoz-Couche C, Brouillard C, Camus F, Laude D, De Boer SF, Becker C and Benoliel JJ.

J Physiol., 591(Pt 7):1871-87, 2013

# Involvement of the dorsomedial hypothalamus and the nucleus tractus solitarii in chronic cardiovascular changes associated with anxiety in rats

Caroline Sévoz-Couche<sup>1</sup>, Charly Brouillard<sup>1</sup>, Françoise Camus<sup>1</sup>, Dominique Laude<sup>2</sup>, Sietse F. De Boer<sup>3</sup>, Chrystel Becker<sup>1</sup> and Jean-Jacques Benoliel<sup>1</sup>

<sup>1</sup>CR-ICM, UPMC/INSERM, UMR-S 975, CNRS UMR 7225, Faculté de médecine UPMC, Site Pitie-Salpêtrière, Paris F-75013, France

<sup>2</sup>Centre de Recherche des Cordeliers, INSERM U872, 15 rue de l'Ecole de Médecine, 75006 Paris, France

<sup>3</sup>Behavioral Physiology, University of Groningen, P.O. Box 11103, 9700 CC Groningen, The Netherlands

## Key points

- Anxiety disorders reduce both the heart rate variability (HRV) and the sensitivity of the cardiac baroreflex (BRS). This may lead to sudden cardiac death.
- To elucidate the mechanisms underlying these alterations, male rats were subjected to social defeat sessions that lead to an anxiety-like state.
- In this model, HRV and BRS were reduced, reflex of a shift of the autonomic balance towards sympathetic predominance.
- Pharmacological blockade of the dorsomedial hypothalamus (DMH) reversed all cardiovascular alterations, whereas blockade of the nucleus tractus solitarii (NTS) 5-HT<sub>3</sub> receptor by the local or systemic administration of granisetron restored only baroreflex gains and the parasympathetic component of HRV.
- In conclusion, repeated social defeat in the rat leads to an anxiety-like state, in which the DMH and the NTS are chronically activated and are responsible for dysautonomia. These regions may constitute new targets against sudden cardiac death.

**Abstract** Anxiety disorders in humans reduce both the heart rate variability (HRV) and the sensitivity of the cardiac baroreflex (BRS). Both may contribute to sudden death. To elucidate the mechanisms underlying these alterations, male rats were subjected to social defeat sessions on four consecutive days. Five days later, the rats were found to be in an anxiety-like state. At this time point, we analysed HRV and BRS in the defeated rats, with or without treatment with the anxiolytic chlordiazepoxide (CDZ). HRV was reduced after social defeat, due to changes in the autonomic balance favouring the sympathetic over the parasympathetic component. Spontaneous and pharmacological baroreflex gains were also reduced. CDZ abolished anxiety-like symptoms as well as HRV and BRS alterations. Inhibition of the dorsomedial hypothalamus (DMH) with muscimol reversed all cardiovascular alterations, whereas blockade of the nucleus tractus solitarii (NTS) 5-HT<sub>3</sub> receptor by the local or systemic administration of granisetron restored only baroreflex gains and the parasympathetic component of HRV. In conclusion, repeated social defeat in the rat lead to an anxiety-like state that was associated with lasting reduction in HRV and baroreflex gains. The DMH and the NTS were responsible for these chronic cardiovascular alterations. These regions may therefore constitute new therapeutic targets for reducing cardiac dysfunction and fibrillation in anxiety disorders.



(Received 2 November 2012; accepted after revision 7 January 2013; first published online 7 January 2013)

**Corresponding author** C. Sévoz-Couche: CR-ICM, UPMC/INSERM, UMR-S 975, CNRS UMR 7225, Faculté de médecine UPMC, Site Pitie-Salpêtrière, 91 bd de l'Hôpital, Paris F-75013, France. Email: caroline.sevoz-couche@upmc.fr

**Abbreviations** BP, blood pressure; BRR, cardiac baroreflex response; BRS, baroreflex sensitivity; CDZ, chlordiazepoxide; D, defeated rats; DMH, dorsomedial nucleus of the hypothalamus; GRANI, granisetron; HF, high-frequency domain; HR, heart rate; HRV, heart rate variability; LF, low-frequency domain; MBP, mean blood pressure; MUSC, muscimol; ND, non-defeated rats; NTS, nucleus tractus solitarius; rMSSD, root mean square of successive R–R interval differences; RSA, respiratory sinus arrhythmia; VEH, vehicle.

## Introduction

Mood disorders are associated with the occurrence of ventricular arrhythmia (Francis *et al.* 2009; Brugada, 2012). There is a solid body of evidence linking the autonomic nervous system to life-threatening arrhythmia and death from cardiovascular causes (Watkins *et al.* 1998; Friedman, 2007), as reduction of heart rate variability (HRV) and the baroreceptor-heart rate (HR) reflex (baroreflex sensitivity, BRS) have been shown to be predictive of the occurrence of ventricular fibrillation (Billman *et al.* 1982; Schwartz, 1998; La Rovere *et al.* 2001). However, the mechanisms underlying these cardiac alterations are still unknown.

A limited number of studies have been conducted in animal models of these diseases, to analyse cardiac and autonomic dysfunctions. Some of these studies used experimentally (Moffitt *et al.* 2002) or genetically (Padley *et al.* 2005) modified animals, while others used systems more closely resembling the physiological reactions observed in humans following the application of a chronic stress (Sgoifo *et al.* 2002; Grippo *et al.* 2008). However, only a few of these studies have analysed the cardiac BRS. Analyses of BRS during or at the end of a chronic stress inducing depression suggested that this parameter was not affected (Grippo *et al.* 2008; Porter *et al.* 2004). Thus, our principal objective was to analyse the long-term effects on HRV and the BRS during an anxiety-like state induced by repeated social defeat (Rivat *et al.* 2010), one of the most severe known stressors (Koolhaas *et al.* 1997). In an experimental design based on anticipation, intruder rats were repeatedly subjected to the threat of an aggressive conspecific resident, which was then allowed to attack and defeat them. This procedure has been shown to induce anxiety-like behaviour 5 days after the last session (André *et al.* 2005; Rivat *et al.* 2010; Blugeot *et al.* 2011). Thus, the aim of this study was to analyse the changes in autonomic balance and baroreflex gain associated with the establishment of this chronic stress-induced anxiety. We also explored the mechanisms that link anxiety to cardiovascular dysregulation. The dorsomedial hypothalamus (DMH) has been shown to

activate sympathetic premotor neurons in the rostral ventro-lateral medulla (Wang *et al.* 2010), and to induce inhibition of the cardiac baroreflex response (BRR). This inhibition is mediated by the release of serotonin from the raphe magnus region, which acts onto presynaptic 5-HT<sub>3</sub> receptors in the nucleus tractus solitarius (NTS; Merahi *et al.* 1992; Sévoz-Couche *et al.* 2003; Netzer *et al.* 2011). Knowing that DMH activation results also in anxiogenic-like effects (Shekhar, 1993; DiMicco *et al.* 2002), we hypothesized that the DMH, and consequently serotonergic receptors in the NTS, are chronically activated after social challenge sessions, and that this will alter cardiovascular parameters. We tested this hypothesis by pharmacological blockade of both regions in anaesthetized animals that had or had not been subjected to social defeat, 6 days after the last session.

## Methods

### Animals

Male Sprague–Dawley rats (Centre d'Élevage R. Janvier, Le Genest-St-Isle, France) weighing 250–300 g were used as experimental intruder animals ( $n = 157$ ). They were housed in individual cages from 7 days before the beginning of the social defeat procedure until the end of the protocol (D–7 to D10; Fig 1A). Wild-type Groningen male rats (*Rattus norvegicus*, WTG strain), originally reared at the University of Groningen (The Netherlands) under conventionally clean conditions and weighing 400–500 g were used as the resident rats in confrontation encounters. All animals were kept under controlled environmental conditions ( $22 \pm 1^\circ\text{C}$ ; 60% relative humidity; 12 h light/dark cycle; food and water *ad libitum*). Procedures involving animals and their care were all performed in conformity with the institutional guidelines, which are in compliance with national and international laws and policies (Council directive 87–848, 19 October 1987, Ministère de l'Agriculture et de la Forêt, Service Vétérinaire de la Santé et de la Protection Animale; permissions 75855 to C. Sévoz-Couche and 6180 to J.-J. Benoliel).

## Procedures

**Social defeat experimental procedure.** Social defeat (Rivat *et al.* 2010) involved four daily conditioning sessions (Fig. 1A) with the same pairs of residents and intruders (Becker *et al.* 2001). Briefly, intruders (defeated (D) animals) were placed singly in a protective cage inside the resident home cage, allowing unrestricted visual, auditory and olfactory contact with the resident but precluding close physical contact. The protective cage was then removed with the resident present, allowing physical confrontation with the intruder (D intruders). There were three–four confrontations of 10 s each, during which the intruding animal was always dominated by the resident rat. For non-defeated (ND) intruders, the intruder had access to the entire resident home cage in the absence of the resident. This social defeat procedure has been shown to induce an anxiety-like state 5 days after the last conditioning session (Rivat *et al.* 2010). Here, we checked

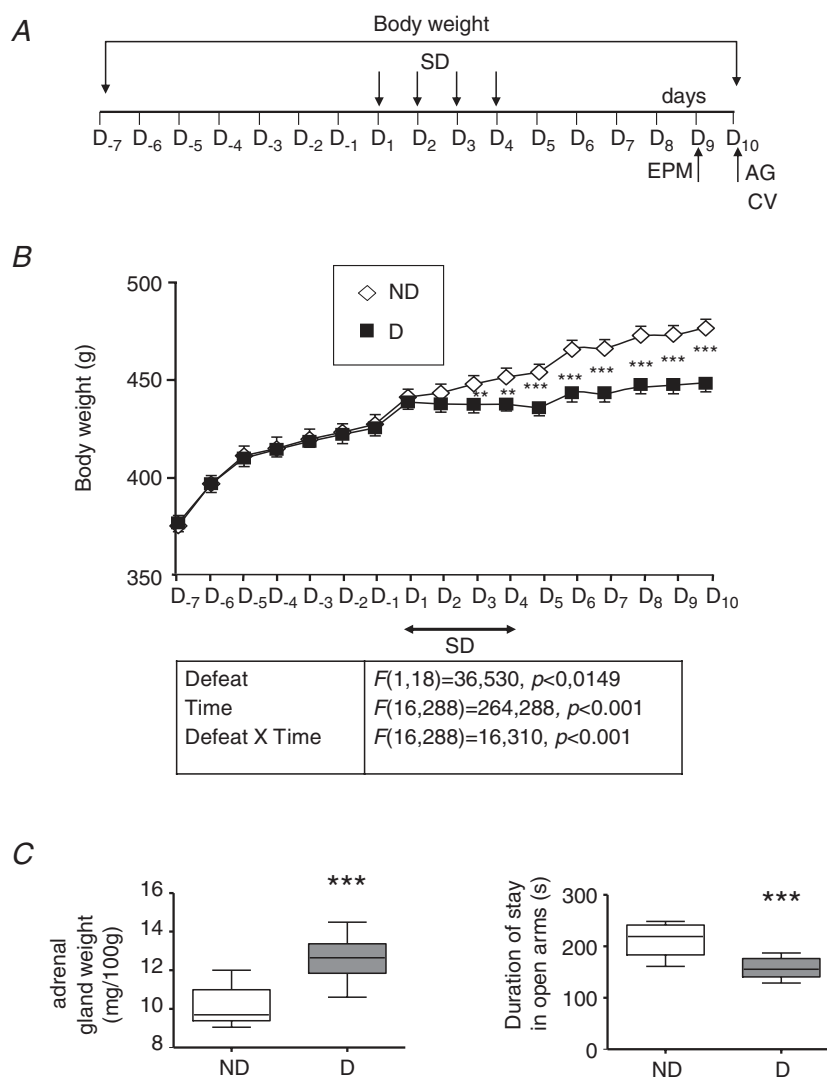
that all D animals presented basic signs of anxiety not observed in ND rats.

**Body weight.** The body weights of D and ND rats were measured daily at 09.00 h, before (7 days, D–7 to D1), during (4 days, D1–D4) and after (6 days, D5–D10) the social defeat procedure.

**Elevated plus-maze test.** Five days after the end of the fourth conditioning sessions (D9; Fig. 1A), the elevated plus-maze test was used to evaluate anxiety-related behaviour in animals. This test has been described in detail elsewhere (Rivat *et al.* 2010). The time spent in the various arms, and the numbers of entries into the open and closed arms of the plus-maze were recorded with custom-made software. The total number (open + closed) of arm entries was taken as an indicator of general activity.

**Figure 1. Long-term consequences of the social defeat protocol for physiological and behavioural parameters in non-defeated (ND) and defeated (D) rats with no treatment**

A, the experimental procedure consisted of four daily conditioning sessions (D1–D4) with the same pairs of residents and intruders. The elevated plus-maze test (EPM) was performed 5 days (D9) after the end of the social defeat procedure, and cardiovascular (CV) parameters and adrenal gland (AG) weight were measured on the following day (D10). Body weight was measured daily in ND and D rats, before, during and 6 days after conditioning sessions (D–7 to D10). B, D animals ( $n = 10$ ) were lighter than ND ( $n = 10$ ) animals. Differences were first observed the day after the first conditioning session (D2) and were maintained until the end of the protocol (D10). Each point is the mean  $\pm$  SEM for D or ND rats.  $**P < 0.005$  and  $***P < 0.001$  vs. ND rats. C, D animals had an increased AG weight and spent less time in the open arms of the EPM. Box–Whisker graphs with minimum and maximum values, lines are the medians.  $***P < 0.001$  vs. ND rats.



**Adrenal gland weight.** At the end of all experiments (D10; Fig. 1A), adrenal glands were removed, dissected free of adhering fat and weighed. Organ weights are expressed relative to total body weight (in mg (100 g body weight)<sup>-1</sup>).

**General procedures for the measurement of cardiovascular parameters.** On the morning after elevated plus-maze tests (D10; Fig. 1A), animals were anaesthetized with pentobarbital sodium (Ceva Santé Animale, Libourne, France; 60 mg kg<sup>-1</sup>, i.p.; Sévoz-Couche *et al.* 1998). The depth of anaesthesia was assessed regularly by pinching a hind paw and monitoring the stability of the arterial blood pressure (BP) and HR recordings. In case of withdrawal reflex and/or significant variations of these parameters, a supplementary dose of pentobarbital was given (10 mg kg<sup>-1</sup>, i.v.). Systemic BP and mean BP (MBP) were monitored via a femoral artery catheter. HR was calculated from the ECG (R-wave pulses) and displayed as mean frequency per minute (bin size = 1 s), and the mean R–R interval duration (RR, ms) was calculated.

**HRV analysis. Spectral (frequency domain) analysis.** ECG waveform data were imported offline into Spike CED (version 6.0). The criteria for segment (90 s) selection for HRV analysis were stationarity and a lack of ectopic beats. Power spectra were obtained by Fourier transformation (size 256, Hanning window, giving a final frequency resolution of 0.04 Hz). Low- and high-frequency (LF and HF, respectively) powers were calculated within the frequency ranges of 0.2–0.7 Hz and 0.7–2.5 Hz, respectively, and the LF-to-HF ratio (LF/HF), a measure of the autonomic ‘balance’ (Friedman, 2007), was determined. An increase in LF/HF ratio indicates a rise in sympathetic activity (Pagani *et al.* 1986). HF power is exclusively under parasympathetic (vagal) control, and the peak frequency in the HF domain corresponds to the respiratory sinus arrhythmia (RSA; Stein *et al.* 1994; Porges *et al.* 2007).

**Temporal (time domain) analysis.** The root mean square of successive R–R interval differences (rMSSD, ms), which specifically quantifies parasympathetic activities (Stein *et al.* 1994), was calculated.

**Spontaneous baroreflex activation.** We used the sequence method to calculate spontaneous HR BRS (spontaneous BRS; Laude *et al.* 2004). Spontaneous BRS was calculated as the mean slope of R–R interval sequences for all sequences detected during 90 s segments of data.

**Pharmacological baroreflex activation.** The administration of nitroprusside (100 µg kg<sup>-1</sup>, i.v.) followed by phenylephrine (10 µg kg<sup>-1</sup>, i.v.) made it possible to evaluate the maximal BRR (maximal BRR in mmHg<sup>-1</sup> = 100 × (ΔHR/HR baseline)/ΔMBP) and to generate baroreceptor function curves, by fitting a sigmoid logistic function to the data. The maximal (i.e. pharmacological maximal BRS) and rectilinear (pharmacological linear BRS) baroreflex slopes were calculated from the baroreceptor curves (Netzer *et al.* 2011).

Animals were killed at the end of the procedures for cardiovascular parameter analyses by a lethal dose of anaesthesia (pentobarbital sodium, 120 mg kg<sup>-1</sup>, i.p.).

## Experiments

All the procedures listed above were performed in each of the following experiments. Five series of experiments were performed on five different series of rats.

**Experiment 1: no treatment.** In this experiment, ND ( $n = 10$ ) and D ( $n = 10$ ) rats received no treatment.

**Experiment 2: chronic anxiolytic treatment.** Social defeat was performed from D1 to D4. Then ALZET osmotic pumps supplying vehicle (VEH) or chlordiazepoxide (CDZ; 10 mg kg<sup>-1</sup> day<sup>-1</sup>) were implanted (Rivat *et al.* 2010) in ND ( $n = 7$  each) and D ( $n = 7$  and 8, respectively) rats on the morning of the day after completion of the social defeat (D5). Briefly, pumps filled with CDZ (ALZET 2ML1) were implanted subcutaneously on the back of the rats under light isoflurane anaesthesia. A small incision was made in the skin between the scapulae. Using a haemostat, a small pocket was formed by spreading the subcutaneous connective tissues apart. The pump was inserted into the pocket. The skin incision was closed with absorbable sutures. Therefore these treatments did not affect body weight before D5. The infusion of VEH or CDZ continued from D5 to D10, to prevent the development of the anxiety-like state (Rivat *et al.* 2010). At D10, we compared the effects of VEH and CDZ on physiological, behavioural and cardiovascular parameters.

**Experiment 3: acute pharmacological blockade of the DMH.** On D10, anaesthetized animals with pentobarbital sodium were placed in a stereotaxic frame, with the head fixed in the flat skull position. Microinjections of saline or muscimol (MUSC; 500 pmol in 0.1 µl) into the DMH were performed at the following coordinates: P 3.0, L 0.5 and V 8 mm from bregma (Netzer *et al.* 2011), in ND ( $n = 6$  and 10, respectively) and D ( $n = 7$  and 13, respectively) animals. Injections were made bilaterally to maximize the

effect and because DMH control of HR has been shown to be asymmetric (Xavier *et al.* 2009). We compared the effects of DMH saline and MUSC on cardiovascular parameters, and we expressed changes as variations from the baseline.

**Experiment 4: acute pharmacological blockade of NTS 5-HT<sub>3</sub> receptors.** As described above, a micropipette filled with either saline or a selective 5-HT<sub>3</sub> receptor antagonist (granisetron (GRANI) 250 pmol in 0.1  $\mu$ l) was inserted into the NTS. Microinjections of saline or GRANI were performed at the level of the calamus scriptorius (L 0.5 and V 0.5 mm; Sévoz-Couche *et al.* 2003) of ND ( $n = 8$  each) and D ( $n = 8$  each) rats on D10. Injections were made bilaterally to maximize the effect (Sévoz-Couche *et al.* 2003). We compared the effects of NTS VEH and GRANI on cardiovascular parameters, and we expressed changes as variations from the baseline.

**Experiment 5: acute pharmacological blockade of peripheral and central 5-HT<sub>3</sub> receptors.** GRANI is a 5-HT<sub>3</sub> receptor antagonist known to cross the blood–brain barrier (Huang *et al.* 1998). Saline or GRANI (10  $\mu$ g kg<sup>-1</sup>) was administered systemically (0.1 ml) in ND ( $n = 10$  each) and D ( $n = 10$  each) anaesthetized rats on D10. We compared the effects of i.v. VEH and GRANI on cardiovascular parameters, and we expressed changes as variations from the baseline.

The effects of MUSC and GRANI lasted for at least 30 min (Sévoz-Couche *et al.* 2003; Netzer *et al.* 2011). HRV and spontaneous BRS parameters were analysed 20 min before and 10 min after treatments, from 90 s segments of recording. The pharmacological BRS was performed 5 min after the HRV and spontaneous BRS analyses, therefore 15 min before and 15 min after treatments.

## Drugs

MUSC and sodium nitroprusside (Sigma Chemicals, St Louis, USA), phenylephrine hydrochloride (Merck Sharp and Dohme-Chibret, Paris, France) and GRANI (SmithKline-Beecham, Harlow, UK) were dissolved in saline. The pH of all solutions microinjected into the NTS was adjusted to 7.4.

## Histological localization of microinjection sites

In experiments 3 and 4, microinjection sites were identified by the location of the micropipette track in 70  $\mu$ m-thick sections of brain tissue previously fixed in 10% formalin solution and cryoprotected in 20% sucrose solution for 5 days. Only rats with the injection point correctly positioned in the DMH or NTS were considered for data analysis.

## Statistical analysis

In Experiment 1, a one-way (subjects) repeated (time)-measures ANOVA was used to compare body weights throughout the protocol, and a one-way (subjects) ANOVA was used to compare other behavioural, physiological and cardiovascular parameters.

In Experiment 2, a two-way (subjects, treatments) repeated (time)-measures ANOVA was used to compare body weights throughout the protocol, and a two-way (subjects, treatments) ANOVA was used to compare the effects of VEH and treatments on other behavioural, physiological and cardiovascular parameters.

In Experiments 3–5, a one-way (subjects) repeated (time)-measures ANOVA was used to compare body weights throughout the protocol, a one-way (subjects) ANOVA was used to compare time spent in the open arms of the elevated plus maze and adrenal gland weight, a two-way (subjects, treatments) ANOVA was used to compare the effects of VEH and treatments on cardiovascular parameters, and a paired Student's *t* test was used to compare cardiovascular parameters before and after treatment in the same animals.

All the statistical results from the two-way ANOVA were given in Supplemental Tables 1–5.

Bonferroni correction was applied to all ANOVAs, and results were considered significant if  $P < 0.05$ .

## Results

### Experiment 1: long-lasting physiological, behavioural and cardiovascular parameters in D ( $n = 10$ ) and ND ( $n = 10$ ) rats with no treatments

Before the start of the social defeat procedure (Fig. 1A), D and ND animals had similar body weights (Fig. 1B). After social defeat sessions, D rats weighted less (–20%) than ND rats. This divergence began from the day after the first conditioning session (D2) and persisted until the end of the procedure (D10).

Adrenal gland weight was higher (Fig. 1C) and time spent in the open arm was lower (Fig. 1D) in D animals, as previously reported (Rivat *et al.* 2010). We found no statistically significant difference in the total number of entries between ND and D rats (ND:  $30.90 \pm 2.99$  and D:  $27.70 \pm 4.39$ ,  $P = 0.07$ ). Thus, the observed difference in time spent in the open arms between these two groups of rats was not due to a change in general activity.

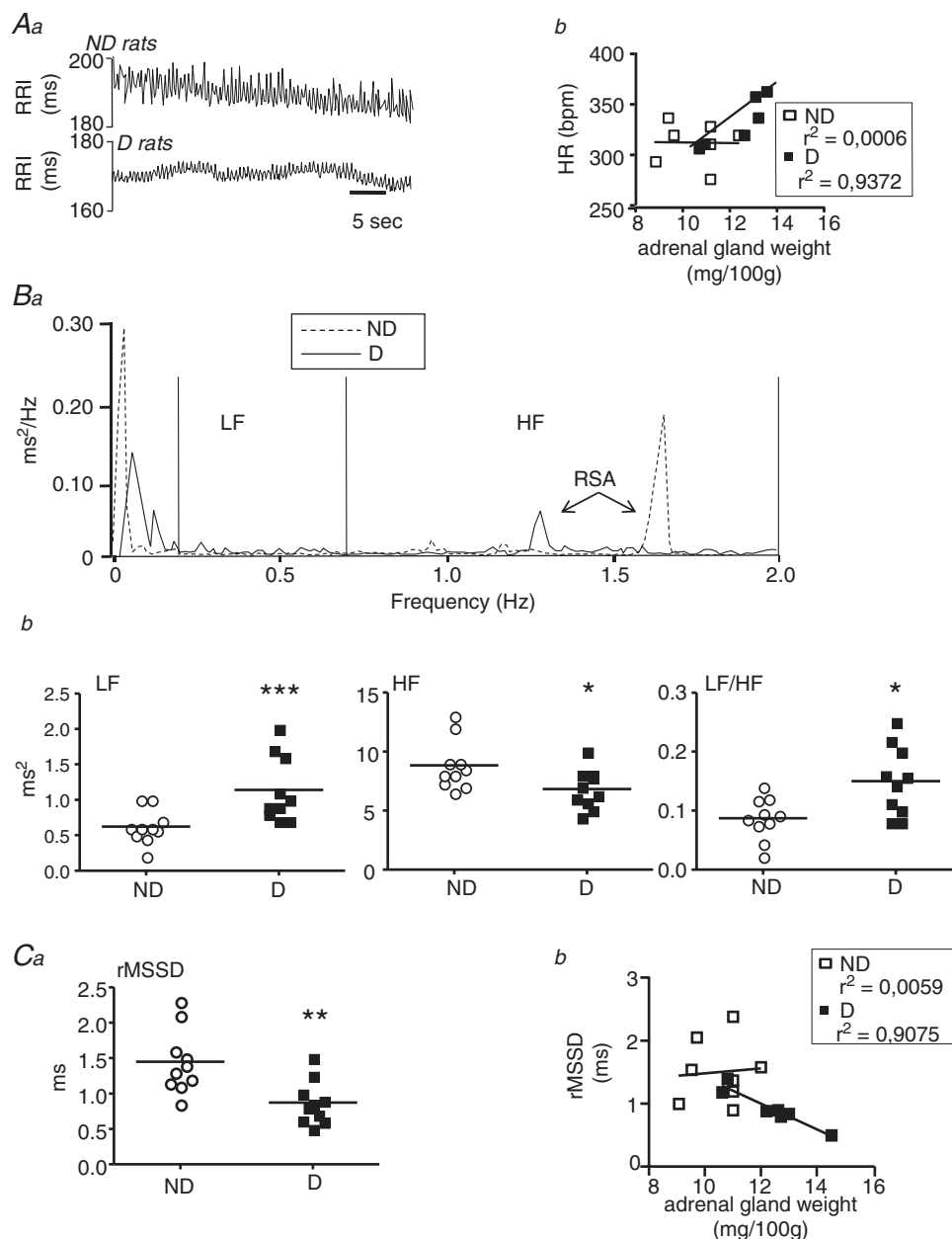
### Cardiovascular parameters

**HR and MBP.** The mean R–R interval was significantly lower in D rats than in ND rats (Fig. 2Aa), corresponding to an increase in HR ( $345 \pm 7$  vs.  $321 \pm 3$  bpm,



respectively,  $P = 0.021$ ). HR was positively correlated with adrenal gland weight in D animals (Fig. 2*Ab*). D and ND animals had similar basal MBP (D:  $102 \pm 3$  vs. ND:  $105 \pm 2$  mmHg, respectively,  $P = 0.68$ ).

**HRV.** We performed power spectral analysis on the ECG (Fig. 2*Ba*). Compared with ND animals, D rats had a reduced HF power associated with an increased LF power and LF/HF ratio (Fig. 2*Bb*). There was thus an



**Figure 2. Long-term consequences of the social defeat protocol for heart rate variability (HRV) in non-defeated (ND) and defeated (D) rats with no treatment**

A, representative R-R interval time series (Aa) showed that the mean R-R interval was lower (indicating an increase in heart rate (HR)) in D animals than in ND animals, and that fluctuations around the mean were much smaller than those in controls. The increase in HR seen in D rats was positively correlated with adrenal gland weight (Ab). B, frequency domain analysis of HRV. Analysis of the power spectra of R-R intervals (Ba) showed a lower high-frequency domain (HF) value in D rats, associated with an increase in low-frequency domain (LF) and LF/HF (Bb). Therefore, a decrease in parasympathetic tone was observed, together with an increase in sympathetic activity, in D rats. Data plots of all animals, lines are the means for D or ND animals.  $*P < 0.05$  and  $***P < 0.001$  vs. ND rats. C, time domain analysis of HRV. The root mean square of successive R-R interval differences (rMSSD) was smaller for D than for ND rats (Ca). Modification in rMSSD was negatively correlated with adrenal gland weight (Cb). Data plots of all animals, lines are the means for D or ND animals.  $**P < 0.005$  vs. ND rats.

increase in sympathetic tone associated with a decrease in parasympathetic tone in animals subjected to social defeat. The altered parasympathetic activity was confirmed by a reduction in rMSSD in D rats (Fig. 2Ca), which was negatively correlated with adrenal gland weight (Fig. 2Cb).

**Baroreflex measurements.** Spontaneous BRS was significantly lower in D than in ND animals (Fig. 3Aa), and was negatively correlated with adrenal gland weight (Fig. 3Ab). During the pharmacological induction of the baroreflex with nitroprusside followed by phenylephrine, the maximal BRR was lower in D ( $0.37 \pm 0.04 \text{ mmHg}^{-1}$ ) than in ND ( $0.62 \pm 0.05 \text{ mmHg}^{-1}$ ,  $P < 0.001$ ) rats. Accordingly, the pharmacological maximal BRS slope calculated from the sigmoid baroreflex curves was lower in D rats (Fig. 3B, left), as was the pharmacological linear BRS (Fig. 3B, right). Values and statistics are given in Fig 3B (lower panel).

To prevent the development of the anxiety-like state (Rivat *et al.* 2010), and to observe the effects of this prevention on cardiovascular parameters, an anxiolytic treatment was given after completion of the social defeat (D5).

### Experiment 2: effects of VEH or chronic anxiolytic treatment in D ( $n = 7$ and 8, respectively) and ND ( $n = 7$ each) rats

In the group of D rats, CDZ treatment maintained normal body weight gain (Fig. 4A), adrenal gland weight and behaviour in the plus maze (Fig. 4B), while no change was observed in ND animals.

#### Cardiovascular parameters

**HR.** HR was significantly higher in D than in ND treated with VEH (D + VEH:  $354 \pm 7$  and ND + VEH:  $320 \pm 7$  bpm,  $P = 0.021$ ). Anxiolytic treatment reduced HR in D rats (D + CDZ:  $321 \pm 8$  bpm,  $P = 0.006$ ), whereas HR remained unaffected in ND animals (ND + CDZ:  $320 \pm 7$  bpm,  $P = 0.91$ ).

**HRV and baroreflex measurements.** LF and LF/HF were higher, and HF and rMSSD were lower in D than in ND rats with VEH (Fig. 4Ca and Cb). These alterations were suppressed by CDZ (Fig. 4Ca and Cb). The treatment had no effect in ND rats.

The lower spontaneous BRS seen in D animals with VEH treatment was also suppressed with CDZ (Fig. 4D). CDZ did not affect spontaneous BRS in ND rats (Fig 4D). Similar results were obtained with pharmacological linear BRS (ND + VEH:  $-4.0 \pm 0.2 \text{ bpm mmHg}^{-1}$  vs. ND +

CDZ:  $-3.5 \pm 0.1 \text{ bpm mmHg}^{-1}$ ,  $P = 0.67$ ; D + VEH:  $-2.5 \pm 0.3 \text{ bpm mmHg}^{-1}$  vs. D + CDZ:  $-4.4 \pm 0.4 \text{ bpm mmHg}^{-1}$ ,  $P = 0.001$ ; Fig. 4E).

The DMH has been shown to be responsible for similar alterations in acute stress (Sévoz-Couche *et al.* 2003; Netzer *et al.* 2011). We therefore analysed the possible involvement of the DMH in this model of chronic stress.

### Experiment 3: effects of VEH and MUSC injections into the DMH on cardiovascular parameters in D ( $n = 7$ and 13, respectively) and ND ( $n = 6$ and 10, respectively) rats

**HR and MBP.** Unlike saline, the changes in HR ( $\Delta\text{HR}/\text{baseline HR}$ ) and MBP ( $\Delta\text{MBP}/\text{baseline MBP}$ ) after MUSC microinjection were greater in D rats than in ND animals (Fig. 5Aa and Ab). HR between-group differences in animals with saline (ND + DMH VEH:  $315 \pm 5$  and D + DMH VEH:  $349 \pm 8$  bpm,  $P = 0.004$ ) were eliminated after MUSC (ND + DMH MUSC:  $310 \pm 7$  and D + DMH MUSC:  $290 \pm 11$  bpm,  $P = 0.75$ ). Parameters returned to baseline after 10 min in D rats, but only after 2 min in ND rats.

**HRV.** Compared with saline, while no change was observed in ND rats, MUSC prevented the changes in HRV in D rats (Fig. 5Ba and Bb). The same was observed when the comparisons were made in D rats before and after the MUSC injection (LF:  $1.55 \pm 0.07$  vs.  $0.77 \pm 0.06 \text{ ms}^2$ , respectively,  $P < 0.001$ ; HF:  $5.46 \pm 0.56$  vs.  $8.84 \pm 0.64 \text{ ms}^2$ , respectively,  $P < 0.001$ ; LF/HF:  $0.17 \pm 0.01$  vs.  $0.11 \pm 0.01$ , respectively,  $P = 0.008$ ; rMSSD:  $1.02 \pm 0.10$  vs.  $1.60 \pm 0.12 \text{ ms}$ , respectively,  $P < 0.001$ ).

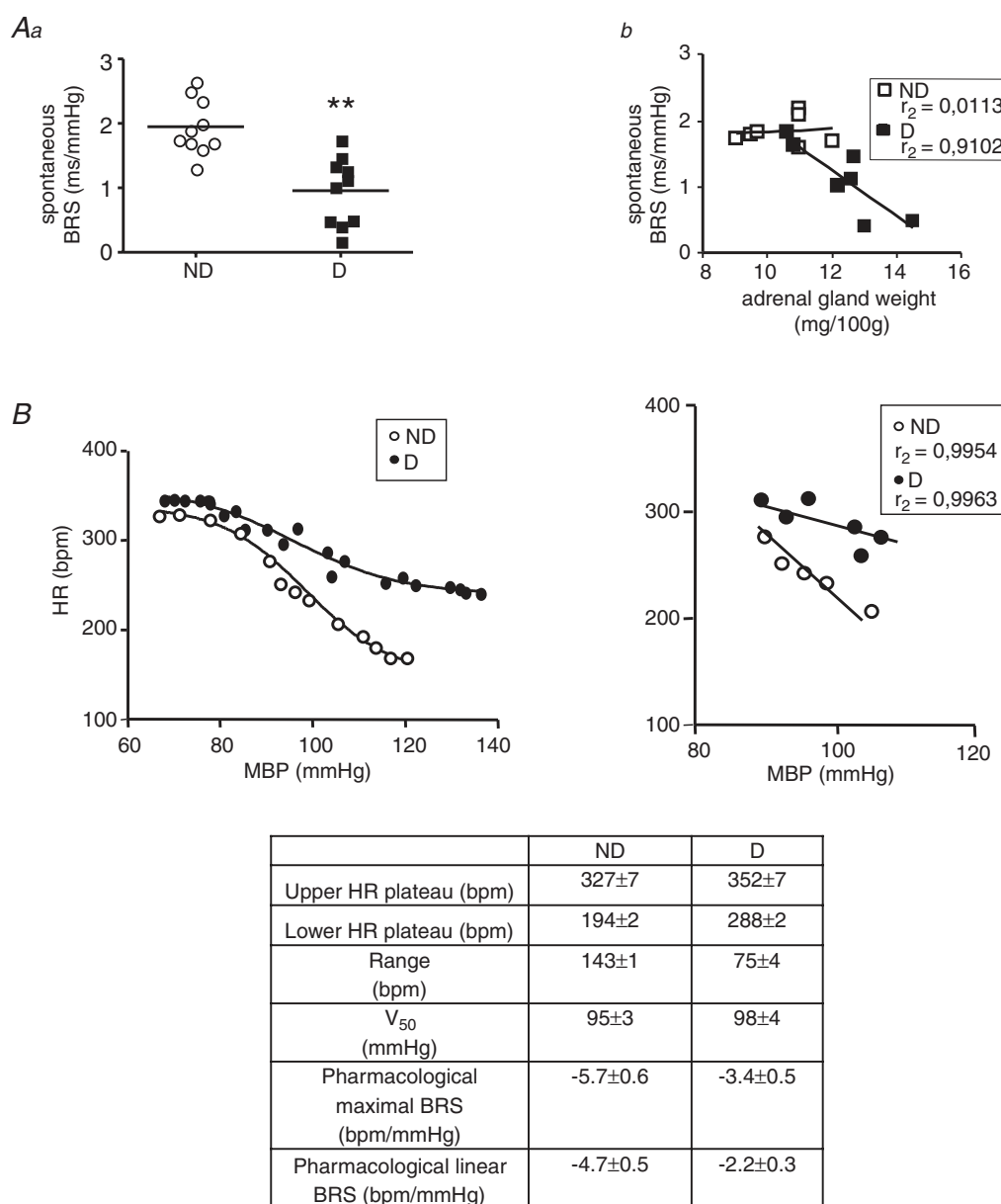
**Baroreflex measurements.** While no change in the spontaneous BRS was observed in ND rats, MUSC compared with saline restored the BRS in D rats (Fig. 5C). The same was observed when the comparison was made in D rats before and after the MUSC injection ( $0.87 \pm 0.13$  vs.  $2.80 \pm 0.28 \text{ bpm s}^{-1}$ , before and after MUSC, respectively,  $P < 0.001$ ).

While no change in linear BRS was observed in ND (ND + DMH VEH:  $-4.3 \pm 0.2 \text{ bpm mmHg}^{-1}$  vs. ND + DMH MUSC:  $-3.9 \pm 0.1 \text{ bpm mmHg}^{-1}$ ,  $P = 0.3$ ) rats, MUSC compared with saline prevented the low linear BRS in D rats (D + DMH VEH:  $-2.0 \pm 0.1 \text{ bpm mmHg}^{-1}$  vs. D + DMH MUSC:  $-4.5 \pm 0.2 \text{ bpm mmHg}^{-1}$ ,  $P = 0.005$ ; Fig. 5D). The same was observed when the comparison was made in D rats before and after the MUSC injection ( $-2.7 \pm 0.2$  vs.  $-4.5 \pm 0.2 \text{ bpm mmHg}^{-1}$ , respectively,  $P = 0.005$ ).

Downstream from the DMH, presynaptic 5-HT<sub>3</sub> receptors in the NTS are responsible for decreasing the baroreflex in conditions of acute stress (Sévoz-Couche *et al.* 2003; Netzer *et al.* 2011). We therefore analysed the possible role of these receptors in our model of chronic stress.

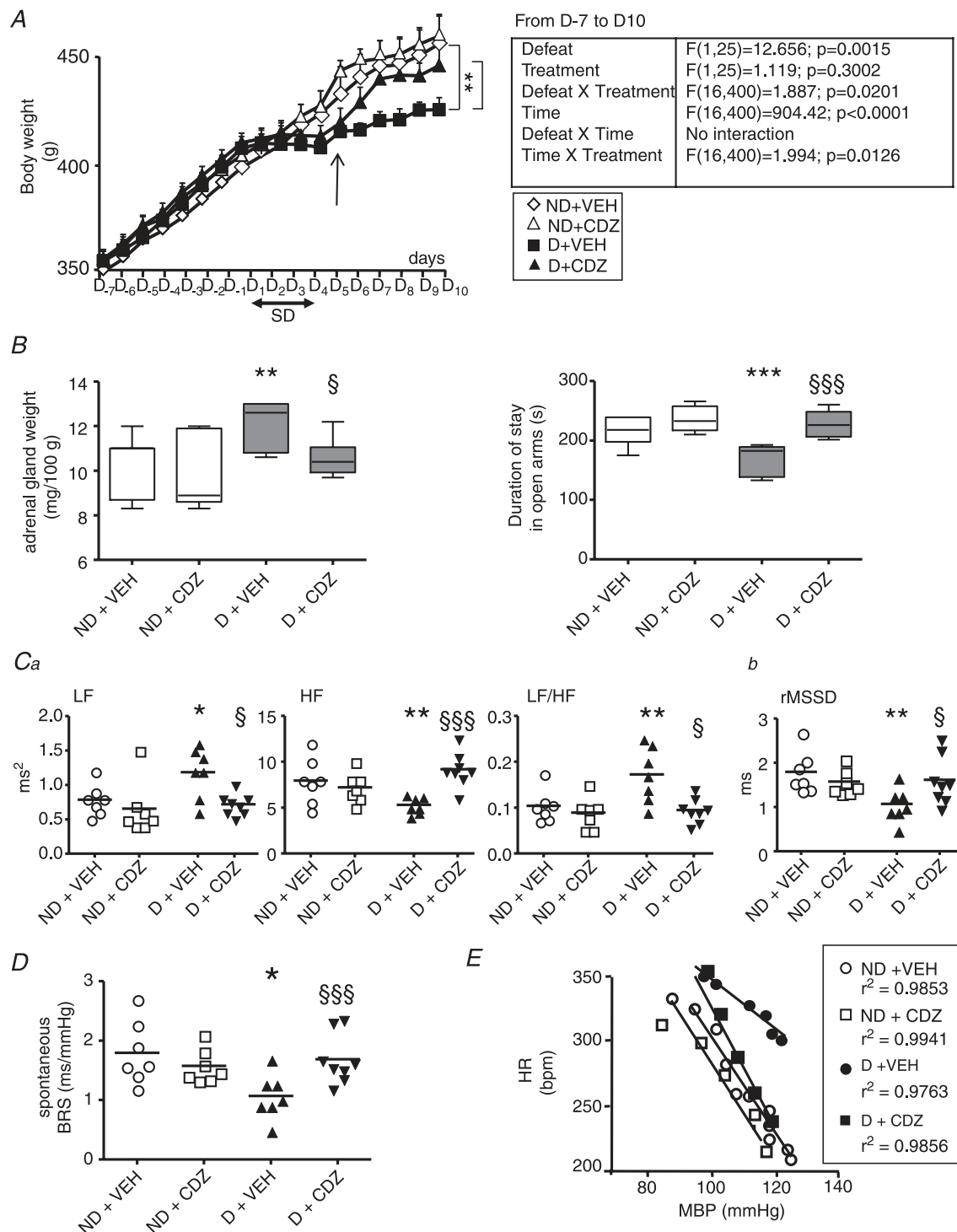
#### Experiment 4: effects of VEH and GRANI injections into the NTS on cardiovascular parameters in D ( $n = 8$ each) and ND ( $n = 8$ each) rats

**HR and MBP.** The microinjection of GRANI into the NTS, unlike that of saline, induced a greater reduction in MBP



**Figure 3. Long-term consequences of the social defeat protocol for baroreflex parameters in non-defeated (ND) and defeated (D) rats with no treatment**

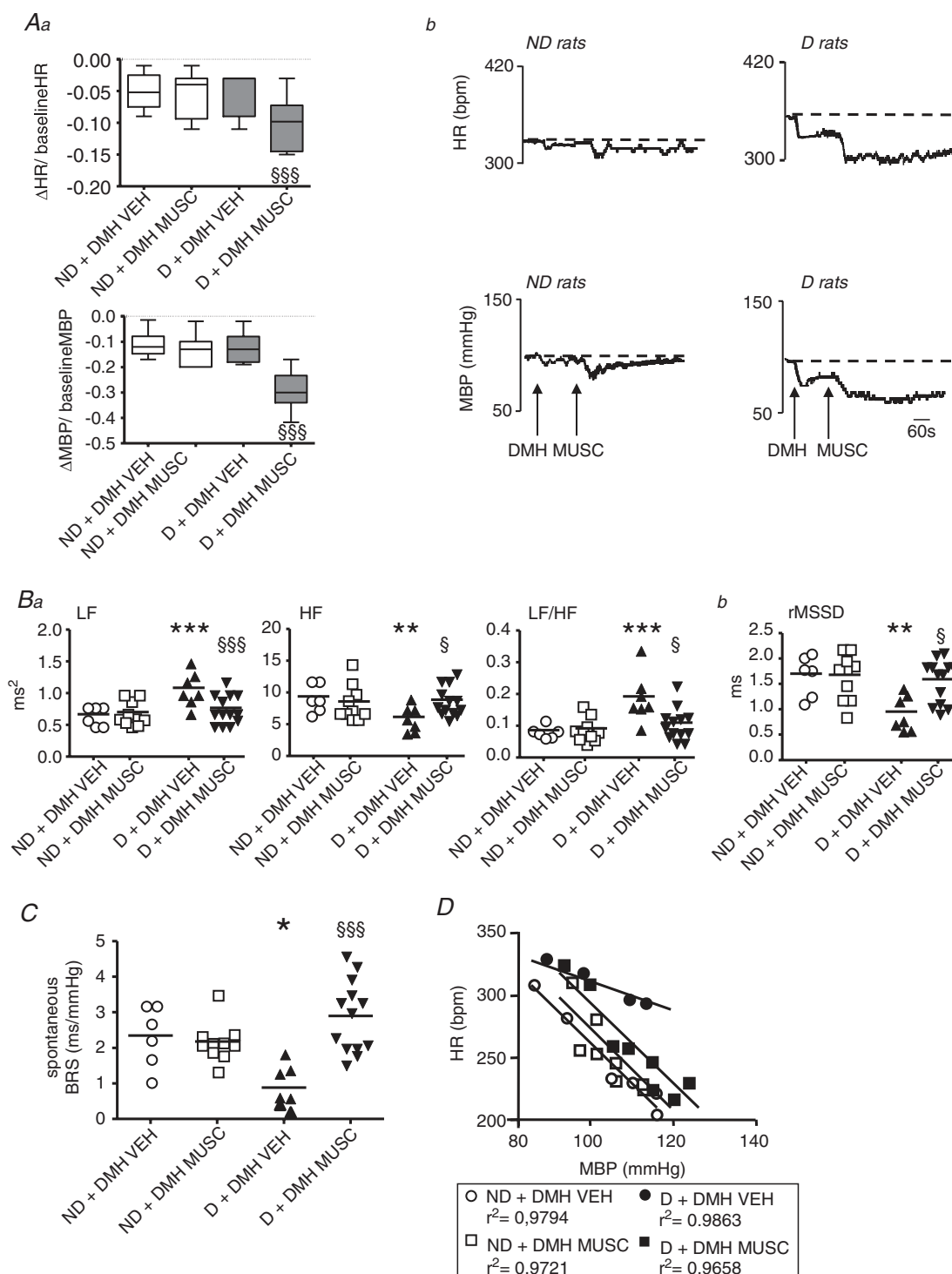
**A**, spontaneous baroreflex sensitivity (BRS), measured by the sequence method, was lower in D than in ND animals (**Aa**), and this decrease was inversely correlated with the development of an anxiety-like state (**Ab**). Data plots of all animals, lines are the means for D or ND rats.  $*P < 0.005$  vs. ND intruders. **B**, the administration of nitroprusside followed by phenylephrine made it possible to generate baroreceptor function curves by fitting a sigmoid logistic function to the data (left). The maximal BRS calculated from the slope of these curves was lower in D than in ND rats. In the same manner, the linear BRS calculated from the linear part of the sigmoid curves (right) was lower in D rats. The values shown in the table are the means  $\pm$  SEM for D and ND rats.



**Figure 4. Effects of vehicle (VEH) and chlordiazepoxide (CDZ) treatment on physiological, behavioural and cardiovascular parameters in non-defeated (ND) and defeated (D) rats**

Compared with VEH, the anxiolytic treatment ( $10 \text{ mg kg}^{-1} \text{ day}^{-1}$ ) given at D5 (A, arrow) prevented the decrease in body weight gain (A), the increase in adrenal gland weight and the decrease in the time spent in open arms (B), the changes in frequency (Ca) and time (Cb) domain parameters for HRV, and the decrease in spontaneous (D) and pharmacological linear (E) BRS in D rats, but not in ND rats. B, box-whisker graphs with minimum and maximum values, lines are the medians.  $**P < 0.005$  and  $***P < 0.001$  vs. ND + VEH;  $§P < 0.05$  and  $§§§P < 0.001$  vs. D + VEH. C and D, data plots of all animals, lines are the means for D and ND rats.  $*P < 0.05$  and  $**P < 0.005$  vs. ND + VEH;  $§P < 0.05$  and  $§§§P < 0.001$  vs. D + VEH.





**Figure 5.** Effects of microinjection into the dorsomedial hypothalamus (DMH) of vehicle (VEH) or muscimol (MUSC) on cardiovascular parameters in non-defeated (ND) and defeated (D) rats

A, MUSC induced larger reductions in heart rate (HR) and mean blood pressure (MBP) from baselines than saline in D but not in ND rats (Aa). Representative tracings of the effects of MUSC are shown in Ab. Box-Whisker graphs with minimum and maximum values, lines are the medians.  $§§§P < 0.001$  vs. D + VEH. B–D, compared with VEH, DMH MUSC prevented the changes in frequency (Ba) and time (Bb) domain parameters for heart rate variability (HRV), spontaneous (C) and pharmacological linear (D) baroreflex sensitivity (BRS) observed in D rats, but had no effect on ND rats. Data plots of all animals, lines are the means for D and ND rats.  $*P < 0.05$ ,  $**P < 0.005$  and  $***P < 0.001$  vs. ND + VEH;  $§P < 0.05$  and  $§§§P < 0.001$  vs. D + VEH.

in D than in ND rats, but had no effect on HR in either group of rats (Fig. 6Aa and Ab). Parameters returned to baseline after 10 min in D rats, but only after 2 min in ND rats.

**HRV.** While HRV parameters were unchanged in ND rats, GRANI compared with saline restored HF and rMSSD in D animals, but not LF and LF/HF (Fig. 6Ba and Bb). The same was observed when the comparisons were made in D rats before and after the GRANI injection (HF:  $5.40 \pm 0.49$  vs.  $7.66 \pm 0.70$  ms<sup>2</sup>, respectively,  $P = 0.036$ ; LF:  $1.12 \pm 0.09$  vs.  $1.03 \pm 0.11$  ms<sup>2</sup>, respectively,  $P = 0.40$ ; LF/HF:  $0.18 \pm 0.01$  vs.  $0.14 \pm 0.01$ , respectively,  $P = 0.09$ ; rMSSD:  $1.10 \pm 0.11$  vs.  $2.10 \pm 0.22$  ms, respectively,  $P = 0.004$ ).

**Baroreflex measurements.** While no change in the spontaneous BRS was observed in ND animals, GRANI compared with saline restored the spontaneous BRS in D rats (Fig. 6C). The same was observed when the comparison was made in D rats before and after the GRANI injection ( $1.01 \pm 0.13$  vs.  $2.75 \pm 0.10$  ms mmHg<sup>-1</sup>, before and after NTS GRANI, respectively,  $P < 0.001$ ).

Compared with saline, GRANI into the NTS had no effect in ND rats (ND + VEH:  $-4.1 \pm 0.2$  vs. ND + GRANI:  $-3.9 \pm 0.4$  bpm mmHg<sup>-1</sup>,  $P = 0.52$ ), but prevented the low pharmacological linear BRS in D rats (D + VEH:  $-2.9 \pm 0.1$  bpm mmHg<sup>-1</sup> vs. D + GRANI:  $-4.5 \pm 0.2$  bpm mmHg<sup>-1</sup>,  $P = 0.01$ ; Fig. 6D). The same was observed when the comparison was made in D rats before and after the GRANI injection ( $-3.1 \pm 0.3$  vs.  $-4.5 \pm 0.2$  bpm mmHg<sup>-1</sup>, respectively,  $P = 0.009$ ).

We have shown that the chronic activation of medullary 5-HT<sub>3</sub> receptors by social defeat procedure alters baroreflex alterations. As GRANI can cross the blood–brain barrier (Huang *et al.* 1998), we investigated the possibility that the systemic administration of this substance could also prevent baroreflex alteration in D rats.

#### Experiment 5: effects of systemically administered VEH or GRANI on cardiovascular parameters in D ( $n = 10$ each) and ND ( $n = 10$ each) rats

**HR and MBP.** Compared with saline, the systemic administration of GRANI induced a greater reduction in MBP in D than in ND rats, but had no effect on HR in either group of rats (Fig. 7Aa and Ab). Parameters returned to baseline after 3 min in D rats, but only after 1 min in ND rats.

**HRV.** While no changes in HRV parameters were observed in ND rats, systemic GRANI treatment compared with

saline restored HF and rMSSD in D rats, but not LF and LF/HF (Fig. 7Ba and Bb). The same was observed when the comparisons were made in D rats before and after the administration of GRANI (HF:  $5.59 \pm 0.54$  vs.  $9.24 \pm 0.58$  ms<sup>2</sup>, respectively,  $P = 0.006$ ; LF:  $1.16 \pm 0.14$  vs.  $1.10 \pm 0.17$  ms<sup>2</sup>, respectively,  $P = 0.59$ ; LF/HF:  $0.15 \pm 0.01$  vs.  $0.12 \pm 0.01$ , respectively,  $P = 0.19$ ; rMSSD:  $0.80 \pm 0.07$  vs.  $1.8 \pm 0.08$  ms, respectively,  $P = 0.001$ ).

**Baroreflex measurements.** While no changes in spontaneous BRS were observed in ND rats, compared with saline, i.v. GRANI restored the spontaneous BRS in D rats (Fig. 7C). The same was observed when the comparison was made in D rats before and after the GRANI administration ( $1.09 \pm 0.12$  vs.  $1.9 \pm 0.16$  ms mmHg<sup>-1</sup>, before and after i.v. GRANI, respectively,  $P < 0.001$ ).

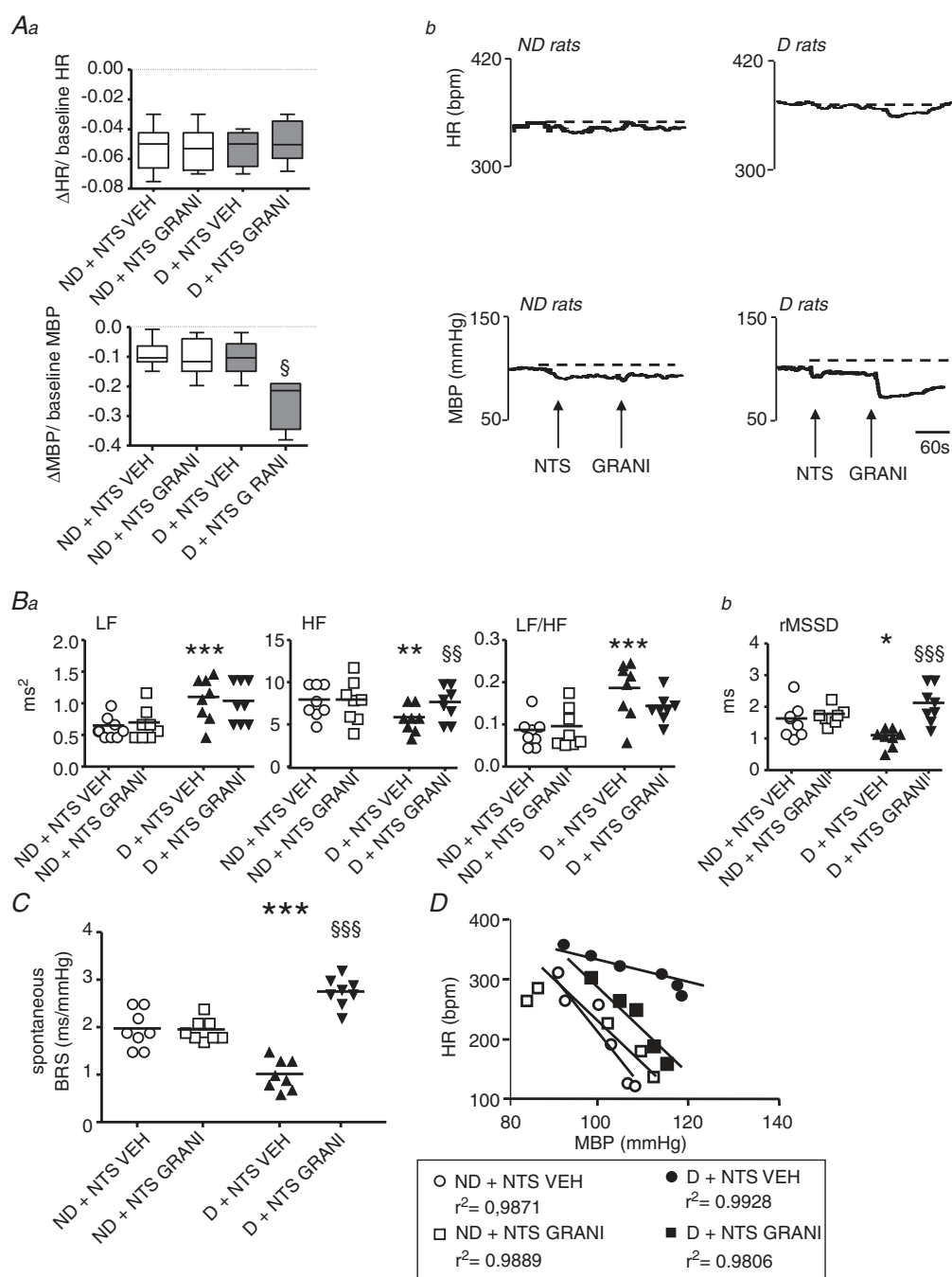
While no change in pharmacological linear BRS was observed in ND rats (ND + VEH:  $-4.1 \pm 0.2$  bpm mmHg<sup>-1</sup> vs. ND + i.v. GRANI:  $-3.9 \pm 0.1$  bpm mmHg<sup>-1</sup>,  $P = 0.72$ ), GRANI administration compared with saline prevented the low linear BRS in D rats (D + VEH:  $-2.1 \pm 0.1$  bpm mmHg<sup>-1</sup> vs. D + i.v. GRANI:  $-4.0 \pm 0.2$  bpm mmHg<sup>-1</sup>,  $P = 0.005$ ; Fig. 7D). The same was observed when the comparison was made in D rats before and after the administration of GRANI ( $-2.5 \pm 0.2$  vs.  $-4.0 \pm 0.2$  bpm mmHg<sup>-1</sup>, respectively,  $P = 0.009$ ).

#### Experiments 3–5: body weight, elevated plus-maze test results and adrenal gland weight in D ( $n = 56$ ) and ND ( $n = 52$ ) animals in experiments with central microinjection or systemic administration

We found that the body weight of D rats measured from D–7 to D10 was less than that of ND rats from the day after the first conditioning session (D2) to the end of the procedure (Supplemental Fig. 1A). We also assessed that adrenal gland weight was higher and time spent in the open arms of the maze was less in D than ND rats (Supplemental Fig. 1B and C, respectively).

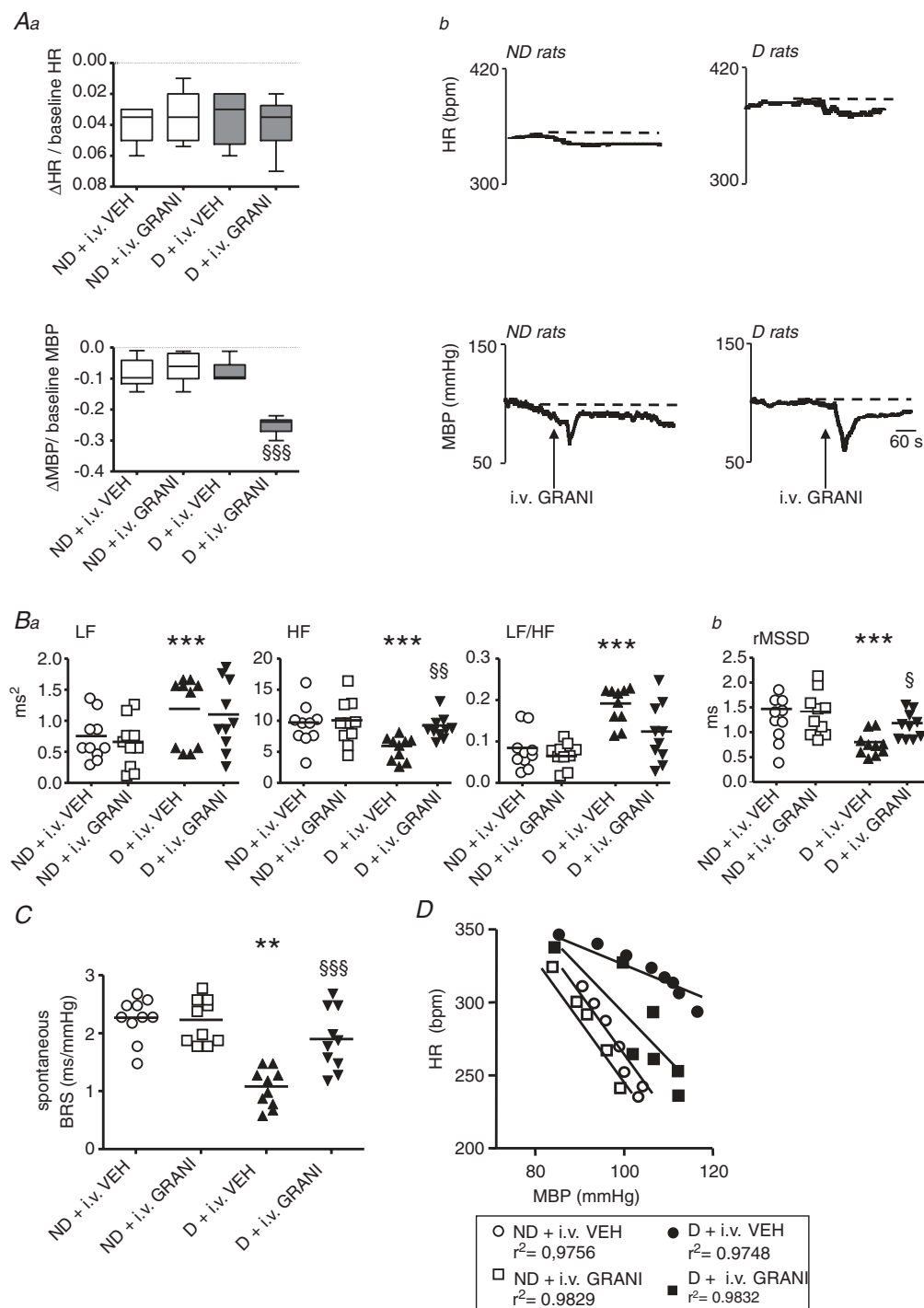
#### Discussion

Our findings demonstrate that chronic social defeat based on anticipation leads, at distance of stressor application, to overall cardiovascular modifications that resemble those seen in anxiety: changes to autonomic balance associated with a decrease in BRS. This dysregulation, which is prevented by anxiolytic treatment, is due to chronic activation of the DMH and NTS 5-HT<sub>3</sub> receptors.



**Figure 6. Effects of microinjection into the nucleus tractus solitarius (NTS) of vehicle (VEH) or granisetron (GRANI) on cardiovascular parameters in defeated (D) and non-defeated (ND) rats**

A, GRANI injection into the NTS induced a larger decrease in mean blood pressure (MBP) but not in heart rate (HR) than saline in D rats, but had no effect on either of these parameters in ND (Aa). Representative tracings of the effects of GRANI injection into the NTS are given in Ab. Box-Whisker graphs with minimum and maximum values, lines are the medians.  $^{\$}P < 0.05$  vs. D + VEH. B, compared with VEH, the injection of GRANI into the NTS abolished the reduction in high-frequency domain (HF) but not the increase in low-frequency domain (LF)/HF in D rats (Ba), and had no effect in ND rats (Ba), suggesting that GRANI reversed the decrease in parasympathetic activity but not the increase in sympathetic activity. This treatment also eliminated the decrease in time domain HRV analysis (Bb) normally induced in D rats, and had no effect on ND rats. Data plots of all animals, lines are the means for D and ND rats. \**P* < 0.05, \*\**P* < 0.005 and \*\*\**P* < 0.001 vs. ND + VEH; §§*P* < 0.005 and §§§*P* < 0.001 vs. D + VEH. C and D, the low spontaneous baroreflex sensitivity (BRS) (C) and pharmacological linear (D) BRS in D rats with VEH was prevented in D rats with i.v. GRANI, and was unchanged in ND rats. \*\*\**P* < 0.001 vs. ND + VEH; §§§*P* < 0.001 vs. D + VEH.



**Figure 7. Effects of the systemic administration of vehicle (VEH) or granisetron (GRANI) on cardiovascular parameters in defeated (D) and non-defeated (ND) rats**

A, systemic administration of GRANI induced a larger decrease in mean blood pressure (MBP) but not in heart rate (HR) than saline in D rats, but had no effect on either of these parameters in ND rats (Aa). Representative tracings of the effects of i.v. GRANI are given in Ab. Box-Whisker graphs with minimum and maximum values, lines are the medians.  $^{§§§}P < 0.001$  vs. D + VEH. B, compared with VEH, i.v. GRANI abolished high-frequency domain (HF) decrease but not the increase in low-frequency domain (LF)/HF in D rats, and had no effect on ND rats (Ba). This treatment also eliminated the decrease in time domain heart rate variability (HRV) analysis (Bb) normally induced in D rats, and had no effect on ND rats. Data plots of all animals, lines are the means for D and ND rats.  $^{***}P < 0.001$  vs. ND + VEH;  $^{\S}P < 0.05$  and  $^{§§}P < 0.005$ . C and D, the low spontaneous (C) and pharmacological linear (D) baroreflex sensitivity (BRS) in D rats with VEH was increased in D rats with i.v. GRANI, and was unchanged in ND rats.  $^{**}P < 0.005$  vs. ND + VEH;  $^{§§§}P < 0.001$  vs. D + VEH.

### Experiments 1 and 2: physiological and cardiovascular modifications after social defeat

Only a few studies have evaluated the cardiovascular modifications induced by social defeat (Sgoifo *et al.* 2002; Beig *et al.* 2009). Most have described HRV, without identifying the mechanisms involved. Moreover, because these studies were performed during, or just after, application of the stressor (Porter *et al.* 2004; Grippo *et al.* 2008), they only evaluated the stress effect, not the effect of an anxiety state. In the present study, experiments were performed 6 days after the end of four consecutive days of social defeat. An absence of body weight gain, an increase in adrenal gland weight and less time spent in the open arms at that time point indicated an anxiety-like state (André *et al.* 2005; Rivet *et al.* 2010), making it possible to evaluate the consequences of chronic stress-induced anxiety on cardiovascular function.

As described in patients with high or low anxiety scores (Watkins *et al.* 1998), BP was not affected by the social defeat procedure. However, D animals had a higher HR and a lower HRV than controls. We first analysed rMSSD and HF power, two measures that are vagally mediated (Schwartz, 1998; Porges *et al.* 2007). We found that both parameters were reduced. The LF/HF ratio, which provides an indirect estimate of sympathovagal balance, increased, as did LF. These results indicate a shift in the autonomic balance towards sympathetic predominance. We also observed a shift of the RSA peak to lower frequencies (Fig. 2Ba). Modifications of the RSA peak frequency, unlike HF and rMSSD (Denver *et al.* 2007; Sin *et al.* 2010; Overbeek *et al.* 2012), may reflect changes in the depth and/or rate of respiration (Denver *et al.* 2007). Further studies are needed to determine whether rats with an anxiety-like profile present modifications in basal respiratory period and tidal volume, although no such changes were found in patients with anxiety (Watkins *et al.* 1998) or depression (Berger *et al.* 2012).

Spontaneous BRS was much lower in D than in ND animals. In addition, the pharmacological range and maximal BRS calculated from the sigmoid curve were smaller in animals presenting an anxiety-like profile. All these data suggest that the reduction in the parasympathetic activity due to chronic stress-induced anxiety results from a diminished BRS. CDZ treatment, which prevented the development of an anxiety-like profile, also prevented the reduction in HRV and BRS. Consistent with these findings, we found that reduced HRV and BRS were positively correlated with an increase in adrenal gland weight. Thus, the baroreflex changes may result from the anxiety state induced by the chronic stress. yes

### Experiment 3: role of the DMH in the cardiovascular modifications induced by social defeat

DMH activation induces a sympathetically mediated increase in HR and MBP (Netzer *et al.* 2011). We found that microinjections of MUSC into the DMH resulted in significantly larger decreases in HR and MBP in D rats, suggesting that both HR and MBP were higher in animals subjected to chronic stress. D rats presented an increase in HR but not in MBP, consistent with findings in patients with high anxiety scores (Watkins *et al.* 1998). There may perhaps be compensatory mechanisms at work on MBP. The injection of MUSC into the DMH prevented both the increase in sympathetic activity and the decrease in vagally mediated HRV in rats subjected to social defeat. In addition, this treatment restored spontaneous and pharmacological baroreflex parameters. These effects lasted at least 30 min, indicating that compensatory mechanisms on HR occurred after MUSC (as HR returned at basal levels after only 10 min). The DMH is clearly overactivated and involved in all the cardiovascular modifications seen in animals subjected to social challenge, and is therefore a key component of the central pathway activated during the anxiety induced by chronic stress.

During acute stress, the DMH acts on the rostral cuneiform nucleus that, in turn, activates the dorsolateral periaqueductal grey (Netzer *et al.* 2011). Downstream to this structure, serotonin is released from the B3 region to the NTS to activate 5-HT<sub>3</sub> receptors and produce baroreflex inhibition (Sévoz-Couche *et al.* 2003). We investigated whether 5-HT<sub>3</sub> receptor blockade could prevent the sympathetic overactivity and baroreflex reduction induced by chronic stress.

### Experiments 4 and 5: role of the NTS in the cardiovascular modifications induced by social defeat

We targeted the NTS receptors by administering GRANI in two ways: by local microinjection into the NTS, the central region with the highest density of 5-HT<sub>3</sub> receptors (Laporte *et al.* 1992); or systemically. In both experiments, GRANI induced a larger decrease in BP (but not in HR) in D rats than in controls, as expected given that the activation of NTS 5-HT<sub>3</sub> receptors induces an increase in MBP only (Sévoz-Couche *et al.* 1998). NTS 5-HT<sub>3</sub> receptors are therefore chronically activated after chronic stress. The effects of these receptors on MBP suggested that NTS 5-HT<sub>3</sub> receptor activation may have been at the origin of the stress-induced increase in sympathetic activity. However, this seems unlikely, as GRANI tended to reduce both LF and the LF/HF ratio, albeit non-significantly, suggesting that sympathetic overactivity persists after NTS 5-HT<sub>3</sub> receptor blockade. We also showed that intravenous



and intra-NTS treatments with GRANI prevented the reduction in spontaneous and pharmacological baroreflex parameters in D animals. Vagally mediated rMSSD and HF, which are normally low in animals subjected to chronic stress, were similar to those in controls after both treatments. Taken together, these results suggest that the reduction of the BRR may be responsible for the lower level of vagal activity observed in animals with social stress-induced anxiety. 5-HT<sub>3</sub> receptors are localized presynaptically on non-cardiovascular (probably from gastrointestinal origin; Leslie *et al.* 1990) NTS vagal afferents. When activated, these receptors trigger glutamatergic activation of local GABAergic interneurons, thereby inhibiting by GABA<sub>A</sub> receptors second-order baroreflex neurons (Sévoz-Couche *et al.* 2003) that project to the nucleus ambiguus on pre-ganglionic vagal neurons responsible for the production of the cardiac response (Loewy, 1990). It is likely that chronic activation of NTS 5-HT<sub>3</sub> receptors due to overactivity of serotonin neurons in the B3 region (containing the raphe magnus and the lateral paragigantocellularis nuclei) and/or hypersensitivity of 5-HT<sub>3</sub> and GABA<sub>A</sub> receptors is at the origin of the chronic baroreflex inhibition.

In conclusion, the long-term changes in HRV associated with social defeat-induced anxiety result from an increase in sympathetic tone associated with a decrease in parasympathetic tone. The latter is possibly due to a decrease in BRS, which may lead to sudden cardiac death (Khaykin *et al.* 1998). The central pathway involved in these changes involves DMH activation, leading to a decrease in baroreflex gain via NTS 5-HT<sub>3</sub> receptor excitation and an increase in sympathetic tone independently of the NTS. Specific treatment for mood disorders restores vagal cardiac function only partially (Carnevali *et al.* 2011). Thus, in patients with high anxiety scores and in patients with induced dysautonomia, as observed after ischaemic stroke for example (Soros & Hachinski, 2012), systemic treatment with the 5-HT<sub>3</sub> receptor antagonist GRANI – a potent anti-emetic (Audhuy *et al.* 1996) with a highly safe profile (Aapro, 2004) – could be used to restore parasympathetic activity and, thus, reduce the likelihood of adverse cardiac events.

## References

- Aapro M (2004). Granisetron: an update on its clinical use in the management of nausea and vomiting. *Oncologist* **9**, 673–686.
- Andre J, Zeau B, Pohl M, Cesselin F, Benoliel JJ & Becker C (2005). Involvement of cholecystokinergic systems in anxiety-induced hyperalgesia in male rats: behavioral and biochemical studies. *J Neurosci* **25**, 7896–7904.
- Audhuy B, Cappelaere P, Martin M, Cervantes A, Fabbro M, Rivière A, Khayat D, Bleiberg H, Faraldi M, Claverie N, Aranda E, Auclerc G, Audhuy B, Benhammouda A, Bleiberg H, Cals L, Cappelaere P, Cattani A, Cervantes A, Chevallier B, Conroy T, Cupissol D, De Grève J, Diaz-Rubio E, Seitz JF, *et al.* (1996). A double-blind, randomised comparison of the anti-emetic efficacy of two intravenous doses of dolasetron mesilate and granisetron in patients receiving high dose cisplatin chemotherapy. *Eur J Cancer* **32**, 807–813.
- Becker C, Thiébot MH, Touitou Y, Hamon M, Cesselin F & Benoliel JJ (2001). Enhanced cortical extracellular levels of cholecystokinin-like material in a model of anticipation of social defeat in the rat. *J Neurosci* **21**, 262–269.
- Beig MI, Baumert M, Walker FR, Day TA & Nalivaiko E (2009). Blockade of 5-HT<sub>2A</sub> receptors suppresses hyperthermic but not cardiovascular responses to psychosocial stress in rats. *Neuroscience* **159**, 1185–1191.
- Berger S, Kliem A, Yeragani V & Bär KJ (2012). Cardio-respiratory coupling in untreated patients with major depression. *J Affect Disord* **139**, 166–171.
- Billman GE, Schwartz PJ & Stone HL (1982). Baroreceptor reflex control of heart rate: a predictor of sudden cardiac death. *Circulation* **66**, 874–880.
- Blugeot A, Rivat C, Bouvier E, Molet J, Mouchard A, Zeau B, Bernard C, Benoliel JJ & Becker C (2011). Vulnerability to depression: from brain neuroplasticity to identification of biomarkers. *J Neurosci* **31**, 12889–12899.
- Brugada J (2012). Psychosis, depression, and high risk for sudden cardiac death: time for co-operation between psychiatrists and cardiologists. *Eur Heart J* **33**, 687–688.
- Carnevali L, Bondarenko E, Sgoifo A, Walker FR, Head GA, Lukoshkova EV, Day TA & Nalivaiko E (2011). Metyrapone and fluoxetine suppress enduring behavioral but not cardiac effects of subchronic stress in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **301**, R1123–R1131.
- Denver JW, Reed SF & Porges SW (2007). Methodological issues in the quantification of respiratory sinus arrhythmia. *Biol Psychol* **74**, 286–294.
- DiMicco JA, Samuels BC, Zaretskaia MV & Zaretsky DV (2002). The dorsomedial hypothalamus and the response to stress: part renaissance, part revolution. *Pharmacol Biochem Behav* **71**, 469–480.
- Francis JL, Weinstein AA, Krantz DS, Haigney MC, Stein PK, Stone PH, Gottdiener JS & Kop WJ (2009). Association between symptoms of depression and anxiety with heart rate variability in patients with implantable cardioverter defibrillators. *Psychosom Med* **71**, 821–827.
- Friedman BH (2007). An autonomic flexibility-neurovisceral integration model of anxiety and cardiac vagal tone. *Biol Psychol* **74**, 185–199.
- Grippe AJ, Moffitt JA & Johnson AK (2008). Evaluation of baroreceptor reflex function in the chronic mild stress rodent model of depression. *Psychosom Med* **70**, 435–443.
- Huang CT, Chen KC, Chen CF & Tsai TH (1998). Simultaneous measurement of blood and brain microdialysates of granisetron in rat by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* **716**, 251–255.

- Khaykin Y, Dorian P, Baker B, Shapiro C, Sandor P, Mironov D, Irvine J & Newman D (1998). Autonomic correlates of antidepressant treatment using heart-rate variability analysis. *Can J Psychiatry* **43**, 183–186.
- Koolhaas JM, De Boer SF, De Rutter AJ, Meerlo P & Sgoifo A (1997). Social stress in rats and mice. *Acta Physiol Scand Suppl* **640**, 69–72.
- Laporte AM, Koscielniak T, Ponchant M, Vergé D, Hamon M & Gozlan H (1992). Quantitative autoradiographic mapping of 5-HT<sub>3</sub> receptors in the rat CNS using [<sup>125</sup>I]iodo-zacopride and [<sup>3</sup>H]zacopride as radioligands. *Synapse* **10**, 271–281.
- La Rovere MT, Pinna GD, Hohnloser SH, Marcus FI, Mortara A, Nohara R, Bigger JT Jr, Camm AJ & Schwartz PJ; ATRAMI investigators. Autonomic Tone and Reflexes After Myocardial Infarction (2001). Baroreflex sensitivity and heart rate variability in the identification of patients at risk for life-threatening arrhythmias: implications for clinical trials. *Circulation* **103**, 2072–2077.
- Laude D, Elghozi JL, Girard A, Bellard E, Bouhaddi M, Castiglioni P, Cerutti C, Cividjian A, Di Rienzo M, Fortrat JO, Janssen B, Karemaker JM, Lefthériotis G, Parati G, Persson PB, Porta A, Quintin L, Regnard J, Rüdiger H & Stauss HM (2004). Comparison of various techniques used to estimate spontaneous baroreflex sensitivity (the EuroBaVar study). *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **286**, R226–R231.
- Leslie RA, Reynolds DJ, Andrews PL, Grahame-Smith DG, Davis CJ & Harvey JM (1990). Evidence for presynaptic 5-hydroxytryptamine<sub>3</sub> recognition sites on vagal afferent terminals in the brainstem of the ferret. *Neuroscience* **38**, 667–673.
- Loewy AD (1990). Anatomy of the autonomic nervous system: an overview. In *Central Regulation of the Autonomic Function*, ed. Loewy AD & Spyer KM, pp. 1–16. Oxford University Press, New-York.
- Merahi N, Orer HS, Laporte AM, Gozlan H, Hamon M & Laguzzi R (1992). Baroreceptor reflex inhibition induced by the stimulation of serotonin<sub>3</sub> receptors in the nucleus tractus solitarius of the rat. *Neuroscience* **46**, 91–100.
- Moffitt JA, Grippo AJ, Holmes PV & Johnson AK (2002). Olfactory bulbectomy attenuates cardiovascular sympathoexcitatory reflexes in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **283**, H2575–H2583.
- Netzer F, Bernard JF, Verberne AJ, Hamon M, Camus F, Benoliel JJ & Sévoz-Couche C (2011). Brain circuits mediating baroreflex bradycardia inhibition in rats: an anatomical and functional link between the cuneiform nucleus and the periaqueductal grey. *J Physiol* **589**, 2079–2091.
- Overbeek TJ, van Bortel A & Westerink JH (2012). Respiratory sinus arrhythmia responses to induced emotional states: effects of RSA indices, emotion induction method, age, and sex. *Biol Psychol* **91**, 128–141.
- Padley JR, Overstreet DH, Pilowsky PM & Goodchild AK (2005). Impaired cardiac and sympathetic autonomic control in rats differing in acetylcholine receptor sensitivity. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **289**, H1985–H1992.
- Pagani M, Lombardi F, Guzzetti S, Rimoldi O, Furlan R, Pizzinelli P, Sandrone G, Malfatto G, Dell'Orto S, Piccaluga E, et al. (1986). Power spectral analysis of heart rate and arterial pressure variabilities as a marker of sympatho-vagal interaction in man and conscious dog. *Circ Res* **59**, 178–193.
- Porjes SW, Heilman KJ, Bazhenova OV, Bal E, Doussard-Roosevelt JA & Koledin M (2007). Does motor activity during psychophysiological paradigms confound the quantification and interpretation of heart rate and heart rate variability measures in young children? *Dev Psychobiol* **49**, 485–494.
- Porter JP, Phillips A, Rich J & Wright D (2004). Effect of chronic stress on the cardiac baroreflex in the post-weanling rat. *Life Sci* **75**, 1595–1607.
- Rivat C, Becker C, Blugeot A, Zeau B, Mauborgne A, Pohl M & Benoliel JJ (2010). Chronic stress induces transient spinal neuroinflammation, triggering sensory hypersensitivity and long-lasting anxiety-induced hyperalgesia. *Pain* **150**, 358–368.
- Schwartz PJ (1998). The autonomic nervous system and sudden death. *Eur Heart J* **19**, F72–F80.
- Sévoz-Couche C, Comet MA, Hamon M & Laguzzi R (2003). Role of nucleus tractus solitarius 5-HT<sub>3</sub> receptors in the defense reaction-induced inhibition of the aortic baroreflex in rats. *J Neurophysiol* **90**, 2521–2530.
- Sévoz-Couche C, Nosjean A, Franc B, Hamon M & Laguzzi R (1998). Dorsal medullary 5-HT<sub>3</sub> receptors and sympathetic premotor neurones in the rat. *J Physiol* **508**, 747–762.
- Sgoifo A, Pozzato C, Meerlo P, Costoli T, Manghi M, Stilli D, Olivetti G & Musso E (2002). Intermittent exposure to social defeat and open-field test in rats: acute and long-term effects on ECG, body temperature and physical activity. *Stress* **5**, 23–35.
- Shekhar A (1993). GABA receptors in the region of the dorsomedial hypothalamus of rats regulate anxiety in the elevated plus-maze test. I. Behavioral measures. *Brain Res* **627**, 9–16.
- Sin PY, Galletly DC & Tzeng YC (2010). Influence of breathing frequency on the pattern of respiratory sinus arrhythmia and blood pressure: old questions revisited. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **298**, H1588–H1599.
- Sörös P & Hachinski V (2012). Cardiovascular and neurological causes of sudden death after ischaemic stroke. *Lancet Neurol* **11**, 179–188.
- Stein PK, Bosner MS, Kleiger RE & Conger BM (1994). Heart rate variability: a measure of cardiac autonomic tone. *Am Heart J* **127**, 1376–1381.
- Wang R, Koganezawa T & Terui N (2010). Differential responses of sympathetic premotor neurons in the rostral ventrolateral medulla to stimulation of the dorsomedial hypothalamus in rabbits. *Brain Res* **1356**, 44–53.

- Watkins LL, Grossman P, Krishnan R & Sherwood A (1998). Anxiety and vagal control of heart rate. *Psychosom Med* **60**, 498–502.
- Xavier CH, Nalivaiko E, Beig MI, Menezes GB, Cara DC, Campagnole-Santos MJ & Fontes MA (2009). Functional asymmetry in the descending cardiovascular pathways from dorsomedial hypothalamic nucleus. *Neuroscience* **164**, 1360–1368.

### Author contributions

C.S.-C. conception and design, or analysis and interpretation of data, drafting the article or revising it critically for important intellectual content & final approval of the version to be published. C.Br., F.C., D.L., S.D.B., analysis and interpretation

of data, drafting the article & final approval of the version to be published. C.Be., analysis and interpretation of data, revising the article critically for important intellectual content & final approval of the version to be published. J.-J.B., conception and design, revising the article critically for important intellectual content & final approval of the version to be published.

### Acknowledgements

We would like to thank Dr Paul Pilowsky (Macquarie University, Sydney, Australia) for his help concerning HRV analysis, and Dr Pascal Carrive (UNSW, Sydney, Australia) for his judicious suggestions on language and style, and interesting comments on the results. This work was supported by grants from INSERM and UPMC.



**Article n°2****Long-lasting increase in sympathetic activity and BDNF upregulation induced by repeated social defeat**

Charly Brouillard, Pascal Carrive, Françoise Camus, Jean-Jacques Bénoliel, and Caroline Sévoz-Couche

## **Long-lasting increase in sympathetic activity and BDNF upregulation induced by repeated social defeat**

Charly Brouillard<sup>1, 2, 3</sup>, Pascal Carrive<sup>4</sup>, Françoise Camus<sup>1</sup>, Jean-Jacques Bénoliel<sup>1</sup>, and Caroline Sévoz-Couche<sup>1, 2, 3</sup>

1- CR-ICM, UPMC/INSERM, UMR-S 975; CNRS UMR 7225, Faculté de médecine UPMC, Site Pitie-Salpêtrière, Paris F-75013, France

2- Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, UMR\_S 1158, Neurophysiologie Respiratoire Expérimentale et Clinique, F-75005, Paris, France

3- INSERM, UMR\_S 1158, Neurophysiologie Respiratoire Expérimentale et Clinique, F-75005, Paris, France

4- Blood Pressure, Brain and Behavior Laboratory, School of Medical Sciences, University of New South Wales, Sydney, NSW, Australia

### **List of contribution:**

CB : study design, data acquisition, data analysis, drafting of manuscript, revising of manuscript in final form

PC : study design, data acquisition, data analysis, revising of manuscript

FC : analysis and interpretation of data

JJB: study design and interpretation of data

CSC: study design, data acquisition, data analysis, drafting of manuscript, revising of manuscript (main investigator)

**Running head:** Anxiety and long-lasting sympathetic modulation

**Corresponding author:** Charly Brouillard, E-mail address: cbrouillard@hotmail.fr

## Introduction

Decades of research, both clinical–epidemiological and experimental on humans and animals, have strengthened the view of a tight link between psychosocial factors and cardiovascular morbidity (Verrier and Lown, 1984), (Rozanski et al., 1999) (Sgoifo et al., 2009). These psychosocial variables appear to be independent risk factors, as important as traditional ones (cholesterol levels, body mass index and poor physical activity), for the onset and progression of hypertension and arrhythmias (Hemingway et al., 2001). These alterations are linked to exaggerated sympathetic stimulation (Wittstein et al., 2005).

An intrinsic limitation of research on humans lies in the difficulty to control and standardize for the individual social history preceding laboratory or clinical assessment. In addition, the application of psychosocial stress stimuli for experimental purposes is obviously limited by ethical concerns and regulations. Animal studies controlling for social environment and adverse social episodes since weaning allow for partially overcoming these limitations. Laboratory stress procedures were used in rodents such as immobilization or electric shock that, although inducing robust physiological activations and pathophysiological consequences, bore poor biological relevance, being based on stimuli that are unlikely in the everyday life and evolutionary history of these species (Sgoifo et al., 2005). On the other hand, disputes for territory control, food resources and sexual partners can be harsh and frequent and may produce severe physical and psychological damage. In humans, social stress episodes do not necessarily imply overt aggressive acts but the social competition that originates from adverse family and work environments is characterized by hostile behaviors that often represent a serious threat to physiological and psychological well-being (Rozanski, 2005). Therefore, the use of highly translational, naturalistic stress models such as social conflict has become more and more widespread in the last years.

In the short term (from few minutes to a few hours) defeat produces elevated plasma levels of glucocorticoids associated to tachycardia, cardiac arrhythmias and hypertension (Sgoifo et al., 1999) (Beig et al., 2009). Additionally, in the long term (days and weeks) relevant behavioral, physiological and neurochemical changes were observed. These include reduced motor and explorative activity, anxiety, and alterations of aggressive and sexual behavior (Ruis et al., 1999) but long-lasting alterations were scarcely studied. Recently, Carnaveli and collaborators found that an altered myocardial electrical stability was observed in rats nine days after the last confrontation (Carnaveli et al., 2013). Recently, we found that a decrease in the heart rate variability (HRV) suggesting an exaggerated sympathetic activation, associated to anxiety, was observed 5 days after the last confrontation (D10) (Sévoz-Couche et al., 2013a). The dorsomedial nucleus of the hypothalamus

(DMH) was involved in this effect (Sévoz-Couche et al., 2013a). Our first aim was to determine whether DMH-induced sympathetic increase persisted at longer term (D30) in a sub-population of animals submitted to social stress.

Stimulation of the DMH elicits pressor and tachycardiac responses through activation of sympathetic premotor neurons in the rostroventrolateral medulla (RVLM) (Wang et al., 2010). Oxidative stress resulting from an imbalance of production over degradation of the reactive oxygen species, particularly superoxide anion ( $O_2^{\cdot-}$ ), is associated with hypertension (Peterson et al., 2006). In the RVLM, overproduction of  $O_2^{\cdot-}$  plays a pivotal role in neural mechanism of hypertension by increasing sympathetic outflow to the peripheral blood vessels, through the implication of the Brain Derived Neurotrophic Factor (BDNF) (Chan et al., 2007) (de Oliveira-Sales et al., 2010). Therefore our second aim was to determine whether social defeat induces a modulation of the BDNF in the RVLM to elicit persistent autonomic alteration.

To answer these questions, we analyzed the effects of cardiovascular alterations of pharmacological blockade of DMH in the NTS by muscimol, a specific GABAA receptor agonist, in anesthetized animals that had or had not been subjected to social defeat, when the anxiety profile had disappeared (D30). Time dependant changes in serum and RVLM BDNF levels were also studied.

## Methods

### Animals

Experiments were carried out in Sprague Dawley male rats (n=95, Centre d'Elevage R. Janvier, Le Genest-St.- Isle, France), weighing 290-310 g. They were housed in individual cages (length, 45 cm; width, 25 cm; height, 17 cm) for one week before the beginning of the experiments. Wild Type Groningen male rats (*Rattus norvegicus*, WTG strain), originally bred at the University of Groningen (The Netherlands) under conventionally clean conditions (Sgoifo et al., 1998), weighing 400–500 g, served as resident rats, in confrontation encounters. The same WTG rats were used for all the successive series of experiments. All animals were kept under controlled environmental conditions ( $22 \pm 1^\circ\text{C}$ ; 60% relative humidity; 12 h light/dark cycle; food and water *ad libitum*). Procedures involving animals and their care were all performed in conformity with the institutional guidelines, which are in compliance with national and European laws and policies (2010/63/EU).

## Experimental overview

The study was organised into two parts (Fig.1).

Study I was a cross sectional study that ended 30 days after the first session of social defeat (D30, n=53). Body weight gain was analysed throughout the entire procedure, and adrenal gland was weight after the end of the procedure, at D30. They were tested twice in the elevated plus maze to assess their anxiety profile: at D9 (five days after the last confrontation, when anxiety behavior might be observed (Sévoz-Couche et al., 2013a)) and at D29 when anxiety profile is low (Rivat et al., 2010). The animals were anesthetised on D30 to record ECG and arterial pressure. Animals received microinjections of muscimol or saline in the DMH while under anesthesia in order to test the role of DMH neurons and NTS 5HT<sub>3</sub> receptors.

Study II (n=42) was a longitudinal study that ended 30 days after the first session of social defeat (D30). These animals were implanted with telemetric probes for daily recording of their ECG, MAP, SAP (systolic arterial pressure) and DAS (diastolic arterial pressure) from D-3 to D29. The animals were anesthetised on D30 to record ECG. Serum BDNF concentrations was analysed before social defeat, and at D10 and D30. In addition, BDNF level in RVLM was analysed at D30.

## General procedures

**Social defeat paradigm.** Social defeat consisted of four daily conditioning sessions (Fig.1) that involved the same pairs of residents and intruders(Becker et al., 2001). Briefly, intruders were placed singly in a protective cage inside the resident home cage, allowing unrestricted visual, auditory, and olfactory contacts with the resident but precluded close physical contact. Then, the protective cage was removed with the resident present, allowing physical confrontation (three to four confrontations of 10 s each, during which the intruding animal was always dominated by the resident rat) with the intruder (defeated intruders); for non-defeated intruders (controls), the intruder had access to the entire resident home cage without resident. This chronic stress model is known to induce an anxiety-like state five days after (D10) (Blugeot et al., 2011; Rivat et al., 2010; Sévoz-Couche et al., 2013b). This profile disappears at D15 (Rivat et al., 2010).

**ECG recordings and canulations under anesthesia and HRV analysis.** ECG recording was performed 30 days after the first session of social defeat (D30, Fig1). The rats were anaesthetized with pentobarbital sodium (Ceva Santé Animale, Libourne, France; 60 mg kg<sup>-1</sup>, I.P.(Sévoz-Couche et al., 1998)) and placed in a stereotaxic frame, with the head fixed in the flat skull position. Systemic blood pressure (BP) and mean BP (MBP) were monitored via a femoral artery catheter.

ECG was recorded using stainless steel pins placed subcutaneously into fore- and hind-paws. These signals were amplified and filtered (Universal Amplifier; Gould, Courtaboeuf, France). ECG signal was then relayed to a 1401 interface (1401 Plus; CED, Cambridge, UK) connected to a computer running Spike 2 (version 6.08) software (CED). Waveform data were imported offline into Spike CED (version 6.0). The RR interval signal was derived from the ECG. Power spectra were calculated using fast Fourier transformation (size 256, Hanning window (Padley et al., 2005)), giving a final frequency resolution of 0.04 Hz. They were performed on the time interval between two consecutive beats (RR interval) derived from the ECG. Low and high frequency (LF and HF, respectively) powers were calculated within the frequency ranges 0.2– 0.7 Hz and 0.7–2.5 Hz, respectively. The LF-to-HF ratio (LF/HF) and normalized LF (LFnu= LF/HF+LF), measures of the autonomic “balance” (Friedman et al., 2007), were determined. An increase in LF-HF ratio and LFnu indicates a rise in sympathetic activity (Pagani et al., 1986).

The criteria for choosing segments for HRV analysis were stability of the signal and lack of ectopic beats. HRV was measured from 90-s segments 20 min before and 5 min after pharmacological blockade of the DMH.

**Body weight.** Body weights in defeated and non-defeated rats were recorded daily at 9:00 A.M., from 7 days before social defeat to the end of the protocol.

**Adrenal gland weight.** At the end of the physiological recording, the animals were killed and their adrenal glands were removed and weighted. Data were expressed relative to body weights (in mg/100 g body weight).

**Elevated plus-maze test (EPM).** At D9 and D29 on the same animals, EPM was used to evaluate anxiety-related behaviour in animals. This test has been described in detail elsewhere (Rivat et al., 2010). The time spent in the various arms, and the numbers of entries into the open and closed arms of the plus-maze were recorded with custom-made software. A lower time spent in open arms and/or a higher time spent in closed arms are considered to be an indicator of an anxiety-like state.

### Specific procedure in Study I

**Cardiovascular monitoring.** On the morning after elevated plus-maze tests (D30, Fig. 1A), animals were anesthetized with pentobarbital (40 mg/kg, i.p.). Mean blood pressure (MBP) and heart rate (HR) were monitored via a femoral artery catheter.

**Pharmacological blockade of the DMH.** Microinjections of either saline or muscimol (Sigma Chemicals, St Louis, USA; 500 pmol in 0.1 µl of saline) into the DMH were performed at the following

coordinates: P 3.0, L 0.5 and V 8mm from bregma (Netzer et al., 2011). Saline and muscimol were given in different rats.

**Histology.** DMH microinjection sites were identified from the tip of the micropipette track in 70  $\mu$ m thick sections of brain tissue previously fixed in 10% formalin solution and cryoprotected in 20% sucrose solution for 5 days. Only rats with the injection sites correctly positioned in the DMH were considered for data analysis.

## **Specific procedure in Study 2**

**Radiotelemetric probe implantation.** Two weeks before social defeat (D-15), rats were implanted with radiotelemetric probes (Data Sciences International, St. Paul, MN, USA) to enable recording of ECG and locomotor activity (Fig 1). The surgery was done in aseptic conditions and under anesthesia (Isoflurane). The rats were also pretreated with an analgesic (Xylocaïne, 5 mg/kg, s.c.), with an anti-inflammatory (metacam, 1 mg/kg, s.c.) and received antibiotics (Benicillin, 0.3 ml, i.p.) at the end of the surgery. The probes were implanted in the peritoneal cavity and wires were tunnelled subcutaneously up the side of the rib cage. The positive lead was attached to the dorsal side of the xiphoid process and the negative lead was passed down between the right sternomastoid and sternohyoid muscles down beside the trachea towards the manubrium and the thoracic inlet (Sgoifo et al., 1996).

**ECG recordings in conscious rats.** Telemetric data were acquired every afternoon (1 to 6 pm) from D-3 to D29, using Dataquest A.R.T. 3.1 Gold software (Data Sciences). ECG waveform data were imported offline into Spike CED (version 6.0) where they were analysed to extract HRV as described above for Study 1. HRV was analysed from 2-min segments of ECG data and averaged across four segments. These segments were chosen on the basis of the quality and stability of the signal when the animal was at rest and immobile. The occurrence of arrhythmic events was determined and quantified off-line based on the Lambeth Conventions for the study of experimental arrhythmias (Curtis et al., 2013). We determined and quantified the separate occurrence of ventricular ectopic beats and the total number of tachyarrhythmic events.

ECG was also recorded on the last day (D30), under pentobarbital sodium anesthesia as mentioned above.

**Serum BDNF assay:** Blood samples (200  $\mu$ l) of awake rats were collected at different time-points (before, D10 and D30 at midday) from the vein of the tail into Eppendorf tubes. After centrifugation, serum was separated and stored at -20°C until analysis for BDNF. BDNF concentrations were

determined at dilution of 1:25 with a commercial BDNF assay (Promega 16 Corporation), in 96-well plates (Corning Costar® EIA plate) (Blugeot et al., 2011).

#### ***RVLM BDNF:***

\* **Extraction:** When the rats were killed (D10 or D30), the brain was rapidly removed. Bilateral RVLM regions were rapidly dissected and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ . At the time of analysis, samples were weighed and BDNF was extracted as described by Szapacs *et al.* (Szapacs et al., 2004). Two ml of lysis buffer (100 mM PIPES, 500 mM NaCl, 0.2% Triton X-100, 0.1% NaN<sub>3</sub>, 2% BSA, 2 mM EDTA) containing freshly prepared protease inhibitors (200M MSF, 0.3M aprotinin, 10M leupeptin) was added to each sample. Samples were then sonicated by pulses of 1 s intervals, for 15 s. An additional 1 ml of lysis buffer was added and the samples were resonicated. All homogenates were centrifuged at  $16,000 \times g$  for 30 min at  $4^{\circ}\text{C}$  and supernatants were removed and frozen at  $-20^{\circ}\text{C}$  until assay.

\* **Assay:** BDNF concentrations were determined at dilution of 1:10 with the commercial BDNF assay described above.

#### **Statistical analysis**

Differences in the behavioural and physiological parameters between D and ND groups were analyzed with a non parametric Mann-Whitney test. Differences in the behavioural and physiological parameters between D and two ND subgroups were analysed with a non parametric Kruskal-Wallis test. Differences in BDNF across time between D and two ND subgroups were analysed with a non parametric Friedman test. Changes in body weight and LF/HF ratio between defeated and non-defeated groups across time were analysed with a two way repeated measure ANOVA. Post-hoc Bonferroni correction was applied after ANOVA when necessary, and results were considered significant if  $P < 0.05$ . Analyses were done with Prism 5.04 (Graph Pad Software).



## Results

### **Study I: Behavioral and cardiovascular changes evoked by social defeat at D30 and contribution of DMH neurons and NTS 5HT3 receptors.**

This group was kept until D30, 26 days after the last session of social defeat (Fig 1). At D30, animals were anesthetized and cardiovascular parameters were recorded.

#### ***Cardiovascular and Physiological parameters***

**HRV:** We performed power spectral analysis of HRV (Table 1). The ratio LF/HF was higher in D (n=19) than in ND (n=34) rats (Fig 2A1). However, a closer look at individual data of the ratio in the D group suggests that it is made up of two subgroups, one with a ratio similar to the ND group and another with a higher value. Consequently, using the highest ratio value of the ND group as the dividing line (0.11), we arbitrarily divided the D group into two subgroups, D<sub>A</sub> above and D<sub>B</sub> below ( $0.196 \pm 0.022$ , n=19, and  $0.075 \pm 0.007$ , n=15, respectively). There was a significant difference in LF/HF between ND and D<sub>A</sub> but not between ND and D<sub>B</sub> animals (Fig 2A2). All further analyses in Study I were based on the separation of the D group in D<sub>A</sub> and D<sub>B</sub> animals.

Using this new classification, LF+HF ( $7.18 \pm 0.86$  ms<sup>2</sup>) and HF ( $5.95 \pm 0.74$  ms<sup>2</sup>) were lower, and LF was higher ( $1.1 \pm 0.15$  ms<sup>2</sup>), in D<sub>A</sub> than in D<sub>B</sub> ( $10.5 \pm 1.1$ ,  $p < 0.09$ ,  $8.1 \pm 1.11$  and  $0.69 \pm 0.08$  ms<sup>2</sup>, respectively,  $p < 0.05$ ) animals ( $p < 0.05$ ). These values were also significantly different from ND values noted in Table 1 ( $p < 0.05$  each).

#### ***HR and MAP:***

According to the preceding results in HRV, HR and MBP were also higher in D<sub>A</sub> than in ND or D<sub>B</sub> animals (Fig 2B).

**Heart volume:** Interestingly, modifications of cardiovascular parameters in line with an exaggerated sympathetic activity in D<sub>A</sub> are associated to a higher total heart volume ( $2.59 \pm$  mg/ g of body weight) than in ND ( $2.39 \pm 0.05$  mg/ g of body weight) and D<sub>B</sub> ( $2.32 \pm 0.05$  mg/ g of body weight) ( $p < 0.05$ ). The Fulton index (right/(left + septum) ventricular weight) was not statistically different between the three groups, though it was higher in D<sub>A</sub> (0.51) than in ND (0.37) and D<sub>B</sub> ( $0.33 \pm 0.05$ ).

Thus an increase in sympathetic activity persisted at long term in a sub-group of animals (D<sub>A</sub>) subjected to social defeat. To determine whether a difference of stress impact occurred between D<sub>A</sub>

and D<sub>B</sub> rats, and to verify the HHS axis level of activation in both sub-groups of rats, we performed body weight gain analysis, behavioral test (EPM) and removing of adrenal glands to be weighed.

*EPM:* This behavioural test was done at D9 and D29 to assess the level of anxiety in the animals. At D9, D<sub>A</sub> as D<sub>B</sub> rats spent more time in closed arms and less in open arms than ND, and all differences disappeared at D29 (Fig 3). No difference between D<sub>A</sub> and D<sub>B</sub> was noted. In conclusion anxiety profile seen at D9 disappeared in both D<sub>A</sub> and D<sub>B</sub> rats at D29.

*Adrenal gland weight.* Similarly, at D30, compared to ND rats ( $11.73 \pm 0.3$  mg/100 mg), D<sub>A</sub> and D<sub>B</sub> rats had comparable adrenal gland weight ( $11.96 \pm 0.31$  and  $11.55 \pm 0.48$  mg/100g, respectively).

*Body weight.* Changes in body weight before, during and after social defeat are shown on Fig 4. There was no difference in body weight between ND, D<sub>A</sub> and D<sub>B</sub> rats in the days that preceded social defeat (Fig 4). However, as expected from previous studies (Sévoz-Couche et al., 2013), D<sub>A</sub> and D<sub>B</sub> rats stopped putting on weight right from the first session of social defeat, while ND rats continued their normal growth. By the end of social defeat, D<sub>A</sub> and D<sub>B</sub> rats were lighter than ND rats ( $402 \pm 2$  and  $402 \pm 4$  vs  $432 \pm 4$  g at D5, respectively). Differences persisted until D11. However, there was no interaction between D<sub>A</sub> and D<sub>B</sub> ( $p=0.84$ ).

### ***Effect of DMH inhibition on HRV in DA rats***

Previous work from our lab has shown that DMH inhibition blockade markedly reduced the long term cardiovascular effect evoked by social defeat when it is recorded at D10 (Sévoz-Couche et al., 2013b). We sought to find out if this was also the case at D30 in ND, D<sub>A</sub> and D<sub>B</sub> rats. As shown on Fig 5, an increase in LF/HF and LFn<sub>u</sub> associated to a reduction in HF and HF<sub>n</sub><sub>u</sub> was still observed after saline but not after bilateral muscimol microinjections into the DMH in D<sub>A</sub> ( $n=7$  and  $n=7$ , respectively) compared to ND ( $n=6$  and  $n=6$ , respectively) and D<sub>B</sub> ( $n=6$  and  $n=6$ , respectively) rats.

Therefore, DMH neurons contribute to long-term cardiovascular changes (increase in sympathetic activity) induced by social defeat in a sub-group of rats. Next, we tried to find out when the DB rats recovered and if there was any difference between D<sub>A</sub> and D<sub>B</sub> rats at an earlier stage.

## **Study II-**

### **Time course of the cardiovascular changes evoked by social defeat.**

This experiment was a longitudinal study conducted on 42 rats implanted with radiotelemetric probes and kept until D30.

#### *HRV*

At D30, all animals were anaesthetised and LF/HF was extracted from the ECG as in Study 1. Comparisons of ND (n= 16) and D (n=26) groups revealed a significant difference ( $p<0.02$ , Fig 6A). We then looked retrospectively at the changes in LF/HF extracted from the daily telemetric recording of ECG in the ND and D rats over the preceding 30 days. A repeated measure ANOVA over the entire (from D-3 to D29) confirmed a significant time and defeat effect ( $p<0.05$ ) (Fig 6B). Both groups of rats had the same average LF/HF before social defeat on D-3 (ND:  $0.094 \pm 0.009$ , D:  $0.093 \pm 0.009$ ). Bonferroni posthoc analysis revealed that the social defeat procedure induced an increase in LF/HF D compared to ND animals at D2 ( $p<0.05$ ) and D10 ( $p<0.05$ ).

As can be seen on Fig 6A, the distribution of LF/HF in the D group at D30 was wide and very similar to that of the Study 1. Consequently, the D group was divided into D<sub>A</sub> and D<sub>B</sub> subgroups according to a dividing line which was the highest LF/HF of the ND group (0.11) (Fig 6C). Comparison of these three groups revealed a significant group effect ( $p<0.0001$ ), with a significantly higher LF/HF in D<sub>A</sub> compared to ND ( $p<0.0001$ ) and D<sub>B</sub> ( $p<0.0001$ ) animals. We then looked retrospectively at the changes in LF/HF extracted from the daily telemetric recording of ECG in the ND, D<sub>A</sub> and D<sub>B</sub> rats over the preceding 30 days. The area under the response time curve above baseline (AUC) of LF/HF was higher in D<sub>A</sub> than in ND and D<sub>B</sub> rats (Fig 6D). A repeated measure ANOVA over the entire 30 days confirmed a significant time and defeat effect ( $p<0.001$ ) (Fig 6E). D<sub>A</sub> and D<sub>B</sub> rats had the same average LF/HF before social defeat on D-3 (D<sub>A</sub>:  $0.108 \pm 0.007$  and D<sub>B</sub>:  $0.076 \pm 0.006$ ). Bonferroni posthoc analysis revealed that the social defeat procedure induced an increase in LF/HF in both groups of defeated animals compared to ND at D2 ( $p<0.01$  for both), but at D4, LF/HF in D<sub>A</sub> was significantly higher than ND ( $p<0.001$ ) and D<sub>B</sub> ( $p<0.05$ ). Higher LF/HF in D<sub>A</sub> lasted until D15 compared to ND ( $p<0.001$ ), and D29 compared to D<sub>B</sub> rats ( $p<0.05$ ).

Telemetric recordings allowed also to obtain continuous HR, MAP, SAP and DAP.

*HR*- A repeated measure ANOVA over the entire 30 days showed a significant group effect in HR ( $p<0.001$ ). The three groups of rats had the same average HR before social defeat on D-3 (ND:  $335 \pm 5$ , D<sub>A</sub>:  $341 \pm 3$  and D<sub>B</sub>:  $336 \pm 3$  bpm, respectively). Bonferroni posthoc analysis revealed that the social defeat performed induced an increase in HR at D4 compared to ND in D<sub>A</sub> only ( $p<0.01$ ) (Fig 7).

*MAP*- A repeated measure ANOVA over the entire 30 days showed a significant group effect in HR ( $p<0.001$ ) (Fig 8A). The three groups of rats had the same average MAP before social defeat on D-3

(ND:  $95 \pm 4$ , D<sub>A</sub>:  $99 \pm 4$  and D<sub>B</sub>:  $96 \pm 6$ ). Bonferroni posthoc analysis revealed that the social defeat procedure induced an increase in MAP in both groups of defeated animals compared to ND at D4 ( $p < 0.001$  for D<sub>A</sub> and  $p < 0.01$  for D<sub>B</sub>). Higher MAP lasted until D9 in D<sub>A</sub> compared to ND ( $p < 0.001$ ).

*SAP*- A repeated measure ANOVA over the entire 30 days showed a significant group effect in HR ( $p < 0.0001$ ) (Fig 8B). The three groups of rats had the same average SAP before social defeat on D-3 (ND:  $112 \pm 4$ , D<sub>A</sub>:  $113 \pm 4$  and D<sub>B</sub>:  $113 \pm 3$ ). Bonferroni posthoc analysis revealed that the social defeat procedure induced an increase in SAP compared to ND from D2 to D4 in D<sub>B</sub> ( $p < 0.01$ ) and at D4 in D<sub>A</sub> ( $p < 0.001$ ). Only SAP in D<sub>A</sub> was higher at D29 than D-3 ( $p < 0.01$ ).

*DAP*- A repeated measure ANOVA over the entire 30 days showed a significant group effect in HR ( $p < 0.001$ ) (Fig 8C). The three groups of rats had the same average DAP before social defeat on D-3 (ND:  $81 \pm 3$ , D<sub>A</sub>:  $84 \pm 4$  and D<sub>B</sub>:  $81 \pm 3$ ). Bonferroni posthoc analysis revealed that the social defeat procedure induced an increase in SAP compared to ND from D2 to D4 in D<sub>B</sub> ( $p < 0.01$ ) and at D4 in D<sub>A</sub> ( $p < 0.001$ ).

Telemetric recordings allowed also to obtain continuous quantification of arrhythmic events. We took into account only ventricular event, with compensatory phasis (Fig 9A). A group and interaction effect was found ( $p < 0.001$ ) (Fig 9B). Ventricular events increased at D4 in both D<sub>A</sub> and D<sub>B</sub> rats compared to ND animals ( $p < 0.05$ ), but this tendency persisted only in D<sub>A</sub> until D29 ( $p < 0.01$ ).

Therefore, long-term exaggerated sympathetic activity was seen in D<sub>A</sub> compared to ND and D<sub>B</sub> rats. As modified serum BDNF levels after social defeat were predictive of a vulnerable sub-population of rats (Blugeot et al., 2011), and RVLM BDNF changes were seen in a chronic model of hypertension (Chan et al., 2010), we analysed both in ND, D<sub>A</sub> and D<sub>B</sub> rats.

### **Serum and RVLM BDNF changes evoked by social defeat.**

BDNF levels were analyzed in ND, D<sub>A</sub> and D<sub>B</sub> rats of study II before the social defeat procedure, and at D10 and D30 (Fig 10A). BDNF levels were similar in the three groups before social defeat ( $p = 0.65$ ). However, serum BDNF was lower in both D<sub>A</sub> and D<sub>B</sub> than ND rats, and this difference persisted at D30 in D<sub>A</sub> rats only. RVLM BDNF levels were also analyzed in ND, D<sub>A</sub> and D<sub>B</sub> rats at D30. Comparisons of

the three groups showed a significant difference in the three groups ( $p=0.0030$ ) (Fig 10B). BDNF level was higher in  $D_A$  than ND rats ( $p<0.01$ ).

## Discussion

Our model of social defeat induced a long lasting sympathetic hyperactivity that could be detected in approximately half of the defeated animals. Importantly, this change was due to an increased activity of the DMH.

Only a few studies have evaluated the cardiovascular modifications induced by social defeat (Sgoifo et al., 2002; Beig et al., 2009). These studies being performed during, or just after application of the stressor (Grippe et al., 2008; Porter et al., 2004), they evaluated the stress effect rather than the effect of an anxiety state.

### *Long-lasting cardiovascular changes induced by social stress*

Previous work from our laboratory has shown that 4 consecutive days of social defeat induces an anxiety-like state that can be detected 5 days after the last session of defeat (D10) (Blugeot et al., 2011; Rivat et al., 2010; Sévoz-Couche et al., 2013b). This anxiety-like state persists at least until D15 (Rivat et al., 2010) but has disappeared at D30 (Blugeot et al., 2011). Recently, we found that HRV derived from ECG recordings using a fast Fourier transformation (Padley et al., 2005) was reduced at D10 in defeated (D) rats (Sévoz-Couche et al., 2013). Low and high frequency (LF and HF, respectively) powers were calculated in this study. The LF-to-HF ratio (LF/HF) and normalized LF (LFnu= LF/HF+LF), measures of the autonomic “balance” (Friedman et al., 2007), were determined in the study by Sévoz-Couche et al., and a profound rise in both parameters was found at D10 (Sévoz-Couche et al., 2013). An increase in LF/HF ratio and LFnu indicates a rise in sympathetic activity (Pagani et al., 1986). Importantly, this change was linked to the anxiety-like state because it was prevented by anxiolytic treatment from D5 to D10 (Sévoz-Couche et al., 2013). However, present data evidenced that exaggerated sympathetic activity was still observed at D30 in a sub-population of anesthetized D animals even though the anxiety-like state was gone at that stage. Subdivision was arbitrarily with a dividing line as the highest LF/HF ratio in non defeated (ND) rats (0.11). This corresponded to a value of 2 SD (standard deviation) as mean $\pm$ SD of LF/HF ratio in ND rats was  $0.07\pm 0.02$ . Thus we applied subdivision of D rats in  $D_A$  (with LF/HF ratio value above the dividing line) and  $D_B$  (with LF/HF ratio value below the dividing line). Interestingly, when this subdivision was taken into account, the LF/HF ratio was higher in  $D_A$  than ND rats, and this parameter was comparable between  $D_B$  and ND rats. Similar result was found for LFnu. This effect was associated to an increase

in HR and MAP, and heart volume, in D<sub>A</sub> compared to ND and D rats. Therefore, a long-lasting rise in sympathetic activity persisted in D<sub>A</sub> rats only. Physical chronic stress impact was not different between D<sub>A</sub> and D<sub>B</sub> rats. First, there was no difference in weight lost during the social defeat between these groups. Second, EMP was applied in same rats at two different terms of the entire procedure, at D10 and D30. D<sub>A</sub> as D<sub>B</sub> rats spent less time in the open arm of the EPM and more time in the closed at D10 compared to ND, but not at D30, indicating an anxiety-like state at D10 but not at D30. Similarly, the adrenal glands of D<sub>A</sub> and D<sub>B</sub> animals were similar compared to ND rats. Therefore long-lasting sympathetic hyperactivity couldn't be linked to persistent sign of anxiety or stress.

Retrospective examination of the changes in LF/HF ratio in the longitudinal study of Study 2 (telemetry) revealed a time interaction between D and ND animals, with persistent changes until D10. However, group effect was significant when subdivision between D<sub>A</sub> and D<sub>B</sub> animals was done. Both AUC and repeated two-way analyses showed that while ND, D<sub>A</sub> and D<sub>B</sub> rats started with similar LF/HF ratio before social defeat, this ratio was high in D<sub>B</sub> compared to ND rats only at D2 and started to recover as early as D4 (though EPM showed that DB rats exhibited an anxiety-like profile at D10), while long-lasting persistent modifications were observed in D<sub>A</sub> animals. It may be a sign that D<sub>A</sub> animals were either more sensitive or had experienced a more intense social defeat or were less resilient. Additional conclusion is that anxiety profile in DB rats is not associated with increase in LF/HF ratio.

This impact on LF/HF in defeated animals was associated to time-dependent modifications in HR and MAP. MAP was increased in both D<sub>A</sub> and D<sub>B</sub> during social defeat compared to MAP in ND rats, due to an increase in both SAP and DAP. However this effect persisted until D10 in D<sub>A</sub> only, especially due to increase in DAP (pulse pressure was reduced at D10 even no significantly, data not shown). Comparisons between D-3 and D29 showed that SAP was higher in D<sub>A</sub> rats only. HR was increased in the same manner in both D<sub>A</sub> and D<sub>B</sub> during social defeat and started to recover as soon as stress procedure ended, showing that compensatory regulation may be seen in conscious compared to anesthetized rats. In addition, this subdivision evidences also the occurrence of ventricular arrhythmias in both D<sub>A</sub> and D<sub>B</sub> during the social defeat, that persisted only in D<sub>A</sub> until D30. This result, along with the long-lasting cardiac hypertrophy in D<sub>A</sub> only, bring new information of a study from Carnavali et al (Carnavali et al., 2014), which concluding that high levels of anxiety-related behavior in rats are associated with signs of increased arrhythmia susceptibility, and cardiac hypertrophy. Indeed, our data showed that even when anxiety was gone, these cardiac alterations, susceptible to leading to death, can still be observed in a subpopulation of individuals.

Therefore, a long-lasting rise in sympathetic activity persisted in D<sub>A</sub> rats only, inducing anatomical and pathological cardiac alterations, while physical (adrenal gland weight) and behavioural (results in EPM) chronic stress impact was not different between D<sub>A</sub> and D<sub>B</sub> rats.

### ***Implication of the DMH and RVLM in the sympathetic alterations induced by social defeat***

We know from previous work that a neuronal pathway involving the DMH plays a key role in autonomic alteration evoked by social defeat at D10 (Sévoz-Couche et al., 2013b). To find out if the DMH was also involved in the sympathetic increase evoked by social defeat in D<sub>A</sub> rats, we blocked the DMH with bilateral microinjections of muscimol in anesthetized animals, we found that muscimol (but not saline) reversed the increase in LF/HF ratio and LFnu (and the decrease in HF, modulated by vagal activity) in D<sub>A</sub> rats, so values were comparable to ND and D<sub>B</sub> rats. This suggests that even if the anxiety-like state was gone, DMH remained activated in a sub-population of defeated rats to modulate the sympathovagal balance. Electrical stimulation of the DMH elicits a defense response, including vasodilation in the skeletal muscles and vasoconstriction in the viscera (Wang et al., 2010). Consequently, DMH activation is associated to increase in HR and MAP (Sévoz-Couche et al., 2013). Direct projections from the DMH to RVLM were evidenced (Dampney et al., 2002) (Horiuchi et al., 2004), and sympathetic responses to DMH activation was reduced by prior blockade of the RVLM (Fontes et al., 2001). Therefore there is a strong possibility that pressor RVLM sites are activated during social defeat to produce sympathetic increase.

Apart from its well-characterized actions as a trophic factor, accumulating evidence suggests that BDNF exhibits “nontrophic” neuroprotective actions. Serum and hippocampal BDNF are reduced in mood disorders (Kreinin et al., 2015) (Şahin et al., 2015). Identification of serum BDNF as a predictive biomarker (linked to oxidative stress) of the vulnerability state to depression, allowed the identification of high-risk individuals to develop depression (Blugeot et al., 2011). Taking into account these data, we first analyzed serum BDNF before, at D10 and D30 in the three groups of rats used in telemetric recordings. We found, as expected, a decrease in blood BDNF levels in D<sub>A</sub> and D<sub>B</sub> rats at D10, compared to ND animals. In the short term, immediately after a chronic stress event, low BDNF levels appear more likely to act as a compensatory response, protecting against deleterious chronic stress-related events, rather than as a maladaptive response (Conrad, 2006). However, at D30, BDNF remained lower in D<sub>A</sub> but recovered in D<sub>B</sub>, showing that D<sub>A</sub> rats may be at higher risk to develop mood disorders when confronted to supplemental stress.

In addition, it was shown that oxidative stress with overproduction of superoxide anion in RVLM is involved in neural mechanisms of hypertension (Zimmerman and Davisson, 2004) (de Oliveira-Sales et al., 2010) (Dugaich et al., 2011). This pathway may involve BDNF. Indeed, injection of BDNF in the RVLM increases MAP (Wang and Zhou, 2002), and transcriptional upregulation of BDNF in RVLM by oxidative stress (as a protective effect) was shown in an experimental model of renal hypertension (Chan et al., 2010). Emotional stress induces oxidative stress in the RVLM at the origin of hypertension, and an antioxidant treatment with tempol prevented this increase in sympathetic activity (Mayorov et al., 2004). Therefore we suggested that BDNF levels may be increased in RVLM after social defeat, as a protective effect against oxidative stress. At D10 (personal data) as D30 (present data), RVLM BDNF levels were increased in D<sub>A</sub> but not D<sub>B</sub> rats. This result confirms HRV and cardiac results indicating that increases in sympathetic activity inducing cardiac alterations was present only in D<sub>A</sub> rats after D5, and implies new information about BDNF as a new marker of cardiac vulnerability.

It is possible that this increase in BDNF in RVLM induced by social stress involves primarily angiotensin II and specific receptors AT1. Indeed, oxidative stress induced in hypertensive models in RVLM are linked to angiotensin II and upregulation of AT1 receptors (de Oliveira-Sales et al., 2010) (Campos et al., 2015). In line with these results, we found that losartan, a specific antagonist of AT1 receptors, in the RVLM, blocked the pressive response to DMH stimulation and that osmotic administration of this compound attenuated LF/HF ratio and MAP increase in defeated rats (personal data).

### **Sources of Funding**

This work received financial support from Legs Poix (LEG1406)

### **Disclosures**

None.



## **Acknowledgments**

Wild-type Groningen strain was generously provided by S. De Boer. The authors would like to thank Dr Paul Pilowsky for his help concerning HRV analysis.

## References

- Becker, C., Thiébot, M.H., Touitou, Y., Hamon, M., Cesselin, F., and Benoliel, J.J. (2001). Enhanced cortical extracellular levels of cholecystokinin-like material in a model of anticipation of social defeat in the rat. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *21*, 262–269.
- Beig, M.I., Baumert, M., Walker, F.R., Day, T.A., and Nalivaiko, E. (2009). Blockade of 5-HT<sub>2A</sub> receptors suppresses hyperthermic but not cardiovascular responses to psychosocial stress in rats. *Neuroscience* *159*, 1185–1191.
- Blugeot, A., Rivat, C., Bouvier, E., Molet, J., Mouchard, A., Zeau, B., Bernard, C., Benoliel, J.-J., and Becker, C. (2011). Vulnerability to depression: from brain neuroplasticity to identification of biomarkers. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *31*, 12889–12899.
- Campos, R.R., Oliveira-Sales, E.B., Nishi, E.E., Paton, J.F.R., and Bergamaschi, C.T. (2015). Mechanisms of renal sympathetic activation in renovascular hypertension. *Exp. Physiol.* *100*, 496–501.
- Carnevali, L., Trombini, M., Rossi, S., Graiani, G., Manghi, M., Koolhaas, J.M., Quaini, F., Macchi, E., Nalivaiko, E., and Sgoifo, A. (2013). Structural and electrical myocardial remodeling in a rodent model of depression. *Psychosom. Med.* *75*, 42–51.
- Carnevali, L., Trombini, M., Graiani, G., Madeddu, D., Quaini, F., Landgraf, R., Neumann, I.D., Nalivaiko, E., and Sgoifo, A. (2014). Low vagally-mediated heart rate variability and increased susceptibility to ventricular arrhythmias in rats bred for high anxiety. *Physiol. Behav.* *128*, 16–25.
- Chan, S.H.H., Wang, L.-L., Tseng, H.-L., and Chan, J.Y.H. (2007). Upregulation of AT<sub>1</sub> receptor gene on activation of protein kinase C $\beta$ /nicotinamide adenine dinucleotide diphosphate oxidase/ERK1/2/c-fos signaling cascade mediates long-term pressor effect of angiotensin II in rostral ventrolateral medulla. *J. Hypertens.* *25*, 1845–1861.
- Chan, S.H.H., Wu, C.-W.J., Chang, A.Y.W., Hsu, K.-S., and Chan, J.Y.H. (2010). Transcriptional upregulation of brain-derived neurotrophic factor in rostral ventrolateral medulla by angiotensin II: significance in superoxide homeostasis and neural regulation of arterial pressure. *Circ. Res.* *107*, 1127–1139.
- Curtis, M.J., Hancox, J.C., Farkas, A., Wainwright, C.L., Stables, C.L., Saint, D.A., Clements-Jewery, H., Lambiase, P.D., Billman, G.E., Janse, M.J., et al. (2013). The Lambeth Conventions (II): guidelines for the study of animal and human ventricular and supraventricular arrhythmias. *Pharmacol. Ther.* *139*, 213–248.
- Dampney, R. a. L., Coleman, M.J., Fontes, M. a. P., Hirooka, Y., Horiuchi, J., Li, Y.W., Polson, J.W., Potts, P.D., and Tagawa, T. (2002). Central mechanisms underlying short- and long-term regulation of the cardiovascular system. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* *29*, 261–268.
- Dugaich, A.P.C., Oliveira-Sales, E.B., Abreu, N.P., Boim, M.A., Bergamaschi, C.T., and Campos, R.R. (2011). Role of the rostral ventrolateral medulla in the arterial hypertension in chronic renal failure. *Int. J. Hypertens.* *2010*, 219358.
- Fontes, M.A., Tagawa, T., Polson, J.W., Cavanagh, S.J., and Dampney, R.A. (2001). Descending pathways mediating cardiovascular response from dorsomedial hypothalamic nucleus. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* *280*, H2891–H2901.

Hemingway, H., Malik, M., and Marmot, M. (2001). Social and psychosocial influences on sudden cardiac death, ventricular arrhythmia and cardiac autonomic function. *Eur. Heart J.* 22, 1082–1101.

Horiuchi, J., McAllen, R.M., Allen, A.M., Killinger, S., Fontes, M. a. P., and Dampney, R. a. L. (2004). Descending vasomotor pathways from the dorsomedial hypothalamic nucleus: role of medullary raphe and RVLM. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 287, R824–R832.

Kreinin, A., Lisson, S., Nesher, E., Schneider, J., Bergman, J., Farhat, K., Farah, J., Lejbkowitz, F., Yadid, G., Raskin, L., et al. (2015). Blood BDNF level is gender specific in severe depression. *PloS One* 10, e0127643.

Mayorov, D.N., Head, G.A., and De Matteo, R. (2004). Tempol attenuates excitatory actions of angiotensin II in the rostral ventrolateral medulla during emotional stress. *Hypertension* 44, 101–106.

Netzer, F., Bernard, J.-F., Verberne, A.J.M., Hamon, M., Camus, F., Benoliel, J.-J., and Sévoz-Couche, C. (2011). Brain circuits mediating baroreflex bradycardia inhibition in rats: an anatomical and functional link between the cuneiform nucleus and the periaqueductal grey. *J. Physiol.* 589, 2079–2091.

De Oliveira-Sales, E.B., Nishi, E.E., Boim, M.A., Dolnikoff, M.S., Bergamaschi, C.T., and Campos, R.R. (2010). Upregulation of AT1R and iNOS in the rostral ventrolateral medulla (RVLM) is essential for the sympathetic hyperactivity and hypertension in the 2K-1C Wistar rat model. *Am. J. Hypertens.* 23, 708–715.

Padley, J.R., Overstreet, D.H., Pilowsky, P.M., and Goodchild, A.K. (2005). Impaired cardiac and sympathetic autonomic control in rats differing in acetylcholine receptor sensitivity. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 289, H1985–H1992.

Peterson, J.R., Sharma, R.V., and Davisson, R.L. (2006). Reactive oxygen species in the neuropathogenesis of hypertension. *Curr. Hypertens. Rep.* 8, 232–241.

Rivat, C., Becker, C., Blugeot, A., Zeau, B., Mauborgne, A., Pohl, M., and Benoliel, J.-J. (2010). Chronic stress induces transient spinal neuroinflammation, triggering sensory hypersensitivity and long-lasting anxiety-induced hyperalgesia. *Pain* 150, 358–368.

Rozanski, A. (2005). Integrating psychologic approaches into the behavioral management of cardiac patients. *Psychosom. Med.* 67 Suppl 1, S67–S73.

Rozanski, A., Blumenthal, J.A., and Kaplan, J. (1999). Impact of psychological factors on the pathogenesis of cardiovascular disease and implications for therapy. *Circulation* 99, 2192–2217.

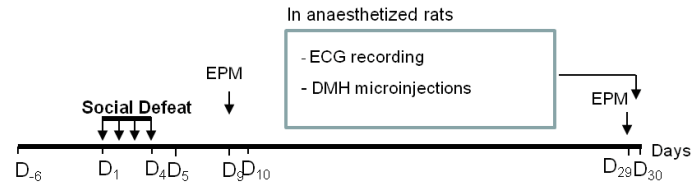
Ruis, M.A., te Brake, J.H., Buwalda, B., De Boer, S.F., Meerlo, P., Korte, S.M., Blokhuis, H.J., and Koolhaas, J.M. (1999). Housing familiar male wildtype rats together reduces the long-term adverse behavioural and physiological effects of social defeat. *Psychoneuroendocrinology* 24, 285–300.

Şahin, T.D., Karson, A., Balci, F., Yazır, Y., Bayramgürler, D., and Utkan, T. (2015). TNF-alpha inhibition prevents cognitive decline and maintains hippocampal BDNF levels in the unpredictable chronic mild stress rat model of depression. *Behav. Brain Res.* 292, 233–240.

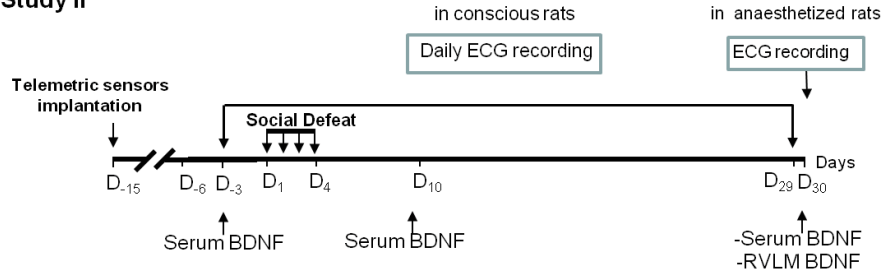
Sévoz-Couche, C., Nosjean, A., Franc, B., Hamon, M., and Laguzzi, R. (1998). Dorsal medullary 5-HT<sub>3</sub> receptors and sympathetic premotor neurones in the rat. *J. Physiol.* 508 ( Pt 3), 747–762.

- Sévoz-Couche, C., Brouillard, C., Camus, F., Laude, D., De Boer, S.F., Becker, C., and Benoliel, J.-J. (2013a). Involvement of the dorsomedial hypothalamus and the nucleus tractus solitarii in chronic cardiovascular changes associated with anxiety in rats. *J. Physiol.* *591*, 1871–1887.
- Sévoz-Couche, C., Brouillard, C., Camus, F., Laude, D., De Boer, S.F., Becker, C., and Benoliel, J.-J. (2013b). Involvement of the dorsomedial hypothalamus and the nucleus tractus solitarii in chronic cardiovascular changes associated with anxiety in rats. *J. Physiol.* *591*, 1871–1887.
- Sgoifo, A., Stilli, D., Medici, D., Gallo, P., Aimi, B., and Musso, E. (1996). Electrode positioning for reliable telemetry ECG recordings during social stress in unrestrained rats. *Physiol. Behav.* *60*, 1397–1401.
- Sgoifo, A., De Boer, S.F., Buwalda, B., Korte-Bouws, G., Tuma, J., Bohus, B., Zaagsma, J., and Koolhaas, J.M. (1998). Vulnerability to arrhythmias during social stress in rats with different sympathovagal balance. *Am. J. Physiol.* *275*, H460–H466.
- Sgoifo, A., Koolhaas, J., De Boer, S., Musso, E., Stilli, D., Buwalda, B., and Meerlo, P. (1999). Social stress, autonomic neural activation, and cardiac activity in rats. *Neurosci. Biobehav. Rev.* *23*, 915–923.
- Sgoifo, A., Costoli, T., Meerlo, P., Buwalda, B., Pico’-Alfonso, M.A., De Boer, S., Musso, E., and Koolhaas, J. (2005). Individual differences in cardiovascular response to social challenge. *Neurosci. Biobehav. Rev.* *29*, 59–66.
- Sgoifo, A., Montano, N., Shively, C., Thayer, J., and Steptoe, A. (2009). The inevitable link between heart and behavior: New insights from biomedical research and implications for clinical practice. *Neurosci. Biobehav. Rev.* *33*, 61–62.
- Szapacs, M.E., Mathews, T.A., Tessarollo, L., Ernest Lyons, W., Mamounas, L.A., and Andrews, A.M. (2004). Exploring the relationship between serotonin and brain-derived neurotrophic factor: analysis of BDNF protein and extraneuronal 5-HT in mice with reduced serotonin transporter or BDNF expression. *J. Neurosci. Methods* *140*, 81–92.
- Verrier, R.L., and Lown, B. (1984). Behavioral Stress and Cardiac Arrhythmias. *Annu. Rev. Physiol.* *46*, 155–176.
- Wang, H., and Zhou, X.-F. (2002). Injection of brain-derived neurotrophic factor in the rostral ventrolateral medulla increases arterial blood pressure in anaesthetized rats. *Neuroscience* *112*, 967–975.
- Wang, R., Koganezawa, T., and Terui, N. (2010). Differential responses of sympathetic premotor neurons in the rostral ventrolateral medulla to stimulation of the dorsomedial hypothalamus in rabbits. *Brain Res.* *1356*, 44–53.
- Wittstein, I.S., Thiemann, D.R., Lima, J.A.C., Baughman, K.L., Schulman, S.P., Gerstenblith, G., Wu, K.C., Rade, J.J., Bivalacqua, T.J., and Champion, H.C. (2005). Neurohumoral features of myocardial stunning due to sudden emotional stress. *N. Engl. J. Med.* *352*, 539–548.
- Zimmerman, M.C., and Davisson, R.L. (2004). Redox signaling in central neural regulation of cardiovascular function. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* *84*, 125–149.

## Study I



## Study II

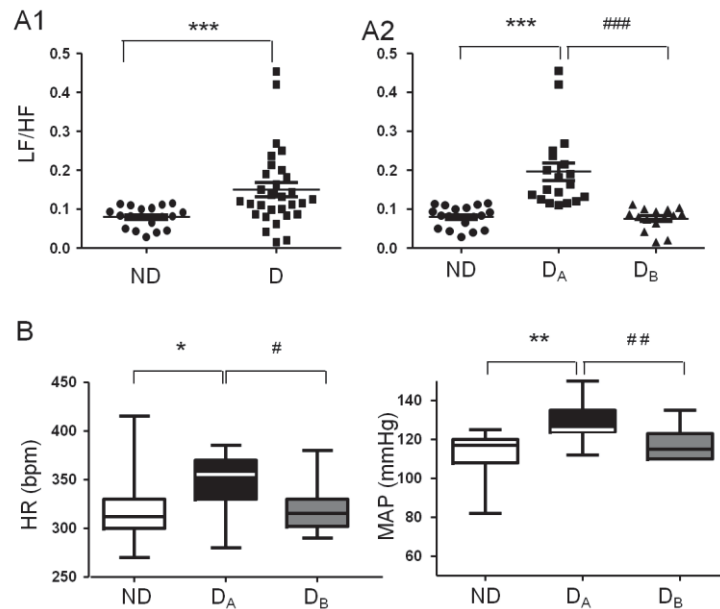


**Figure 1: Protocol of social defeat**

The experimental procedure consisted of four daily conditioning sessions (D1–D4) involving the same pairs of residents and intruders. There were two main studies during which HRV parameters were extracted from ECG.

In Study I, they were extracted under anaesthesia at D30 with microinjections in the DMH. The elevated plus maze (EPM) test was performed at D9 and D29.

In Study II LF/HF ratio, was extracted daily in conscious rats implanted with radio-telemetric probes, and finally under anaesthesia at D30. Serum BDNF were taken three times on same animals, at D-3, D10 and D30. BDNF was also analysed in RVLM at D30.



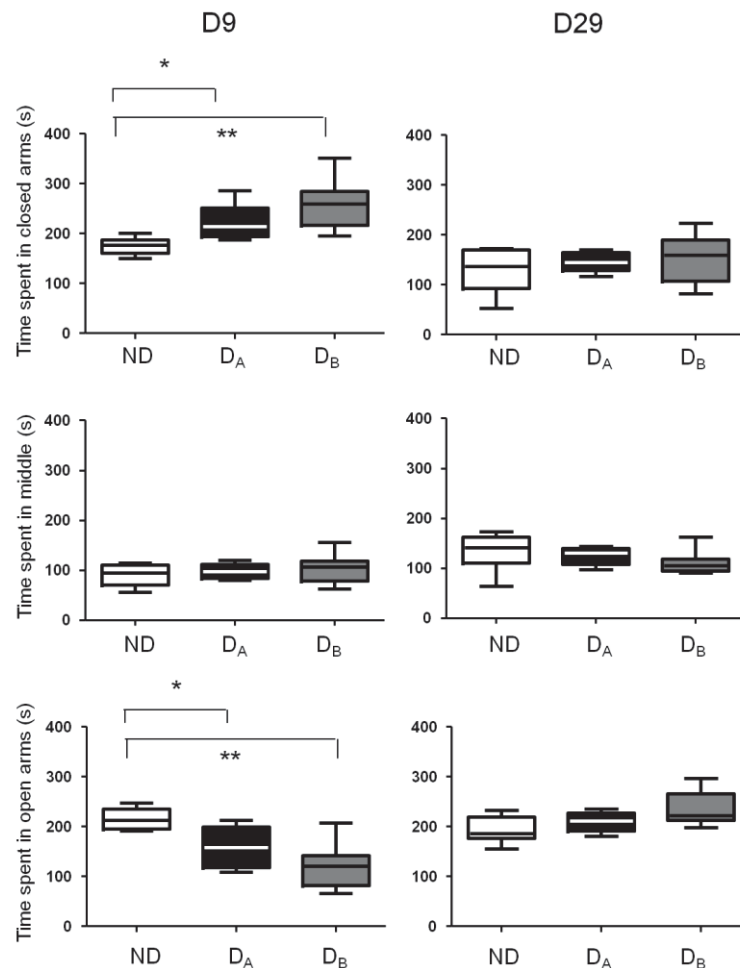
**Figure 2: Long-term consequences of the social defeat protocol for heart rate variability (HRV) in anesthetized non-defeated and defeated rats (Study I)**

A1- Analysis of the power spectra of RR intervals showed a higher LF/HF ratio value in defeated (D) than non-defeated (ND) rats. Data plots of all animals, lines are the means, \*\*\*p<0.001 versus ND.

A2- D rats could be arbitrarily separated using the highest LF/HF ratio of the ND group as the dividing line (0.11). Consequently, two subgroups were obtained, D<sub>A</sub> (LF/HF above 0.11) and D<sub>B</sub> (LF/HF below

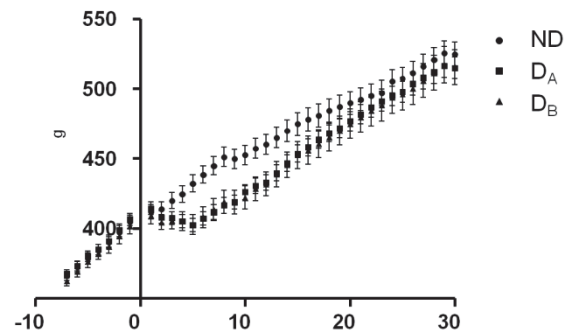
0.11). Ratio in DB was similar to ND rats, while that in DA was higher compared to ND and DB animals. Data plots of all animals, lines are the means, \*\*\* $p < 0.001$  versus ND, ### $p < 0.001$  versus DB.

B- In the same manner, heart rate (HR) and mean arterial pressure (MAP) were higher in DA than ND and DB rats. Box-Whisker graphs with min and max values, lines are the medians. \* $p < 0.05$  versus ND, # $p < 0.05$  versus DB.



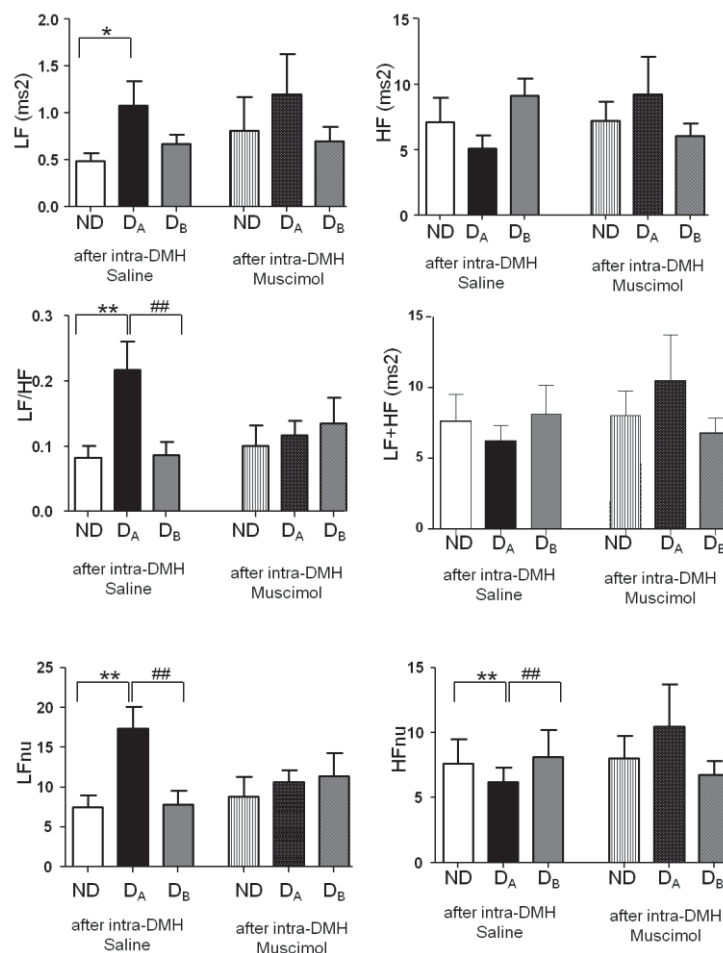
**Figure 3: Evaluation of the anxious profile in ND, D<sub>A</sub> and D<sub>B</sub> rats in the elevated plus maze test at D9 and D29 (Study I)**

At D9, D<sub>A</sub> and D<sub>B</sub> rats spent more time in closed arms and less time in open arms than ND animals. However, no difference was seen between the groups in either arms at D29. Box-Whisker graphs with min and max values, lines are the medians. \* $p < 0.05$  and \*\* $p < 0.01$  versus ND.



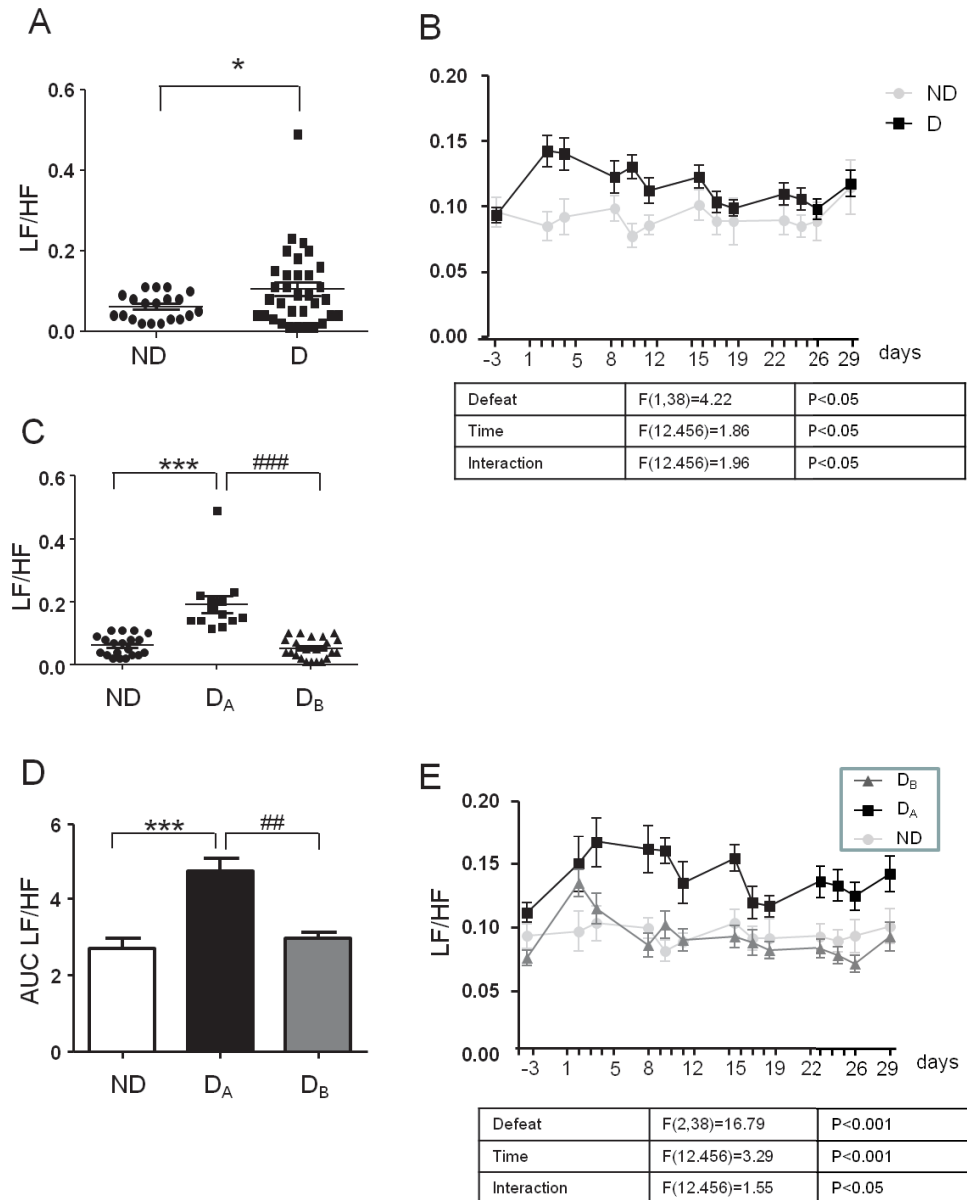
Defeat	F(2.46)=1.63	P=0.20
Time	F(36.1656)=680.3	P<0.0001
Interaction	F(72.1656)=4.44	P<0.0001

**Figure 4: Long-term effects (D30) of social defeat on Body weight in ND, D<sub>A</sub> and D<sub>B</sub> rats (Study I)**  
Body weights of D<sub>A</sub> and D<sub>B</sub> animals were lower than those of ND rats during the first days of conditioning sessions and at least until D10. However, at D30, these differences disappeared. Each point is the mean±SEM of data obtained in ND, D<sub>A</sub> and D<sub>B</sub> rats.



**Figure 5: Effect of blockade of DMH on HRV parameters at D30 in ND, D<sub>A</sub> and D<sub>B</sub> anesthetized rats (Study I)**

The increase in LF, LF/HF and LFnu in D<sub>A</sub> compared to ND and D<sub>B</sub> rats persisted after microinjections of saline but not muscimol into the DMH. Values are the mean±SEM. \*p<0.05 and \*\*<0.01 versus ND, ##p<0.05 versus D<sub>B</sub>.



**Figure 6: Long-term effects of social defeat on LF/HF in anesthetized and non-anesthetized non-defeated and defeated rats implanted with telemetric probes (Study II)**

A- Analysis of the power spectra of RR intervals showed a higher LF/HF ratio value in defeated (D) than non-defeated (ND) rats. Data plots of all animals, lines are the means, \* $p<0.05$  versus ND.

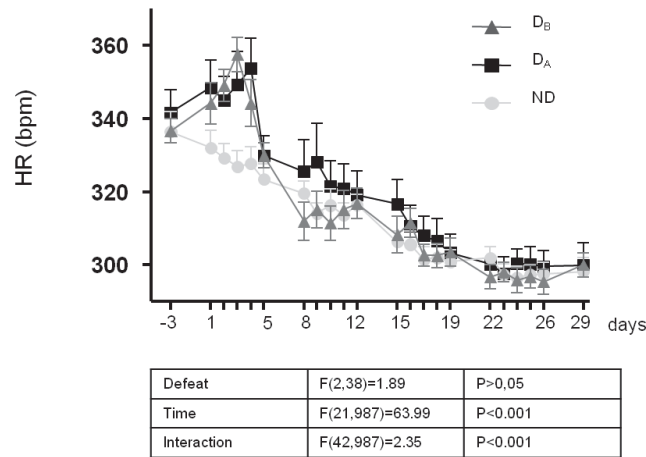
B- Daily evolution of LF/HF ratio in ND and D rats, showing a group effect. Values are the mean $\pm$ SEM.

C- D rats could be arbitrarily separated using the highest LF/HF ratio of the ND group as the dividing line (0.11). Consequently, two subgroups were obtained,  $D_A$  (LF/HF above 0.11) and  $D_B$  (LF/HF below 0.11). Ratio in  $D_B$  was similar to ND rats, while that in  $D_A$  was higher compared to ND and  $D_B$  animals. Data plots of all animals, lines are the means, \*\*\* $p<0.001$  versus ND, ### $p<0.001$  versus  $D_B$ .

D- From the daily evolution of LF/HF ratio in these three groups, the area under the curve (AUC) was calculated. A low AUC was observed only in  $D_A$  rats compared to ND and  $D_B$ . Values are the mean $\pm$ SEM. \*\*\* $p<0.001$  vs ND, ##  $p<0.01$  vs  $D_B$ .

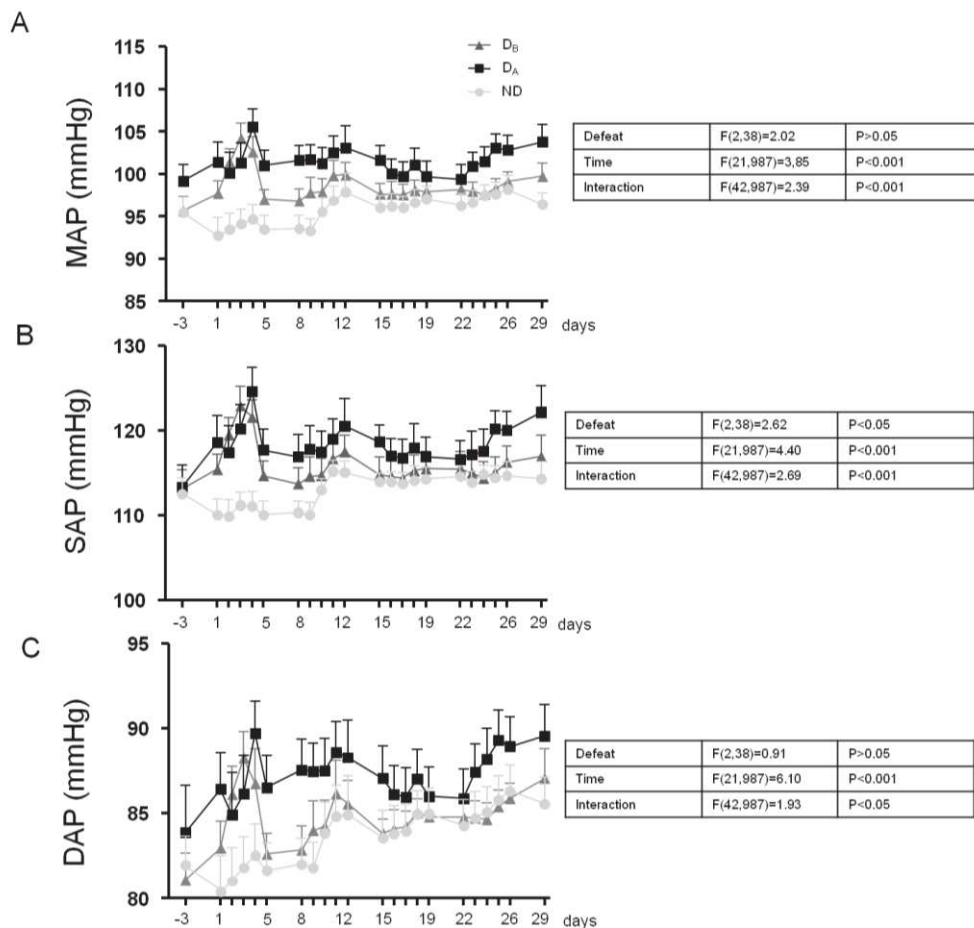
E- Daily evolution of LF/HF ratio in ND,  $D_A$  and  $D_B$  rats, showing a group effect. Values are the mean $\pm$ SEM.





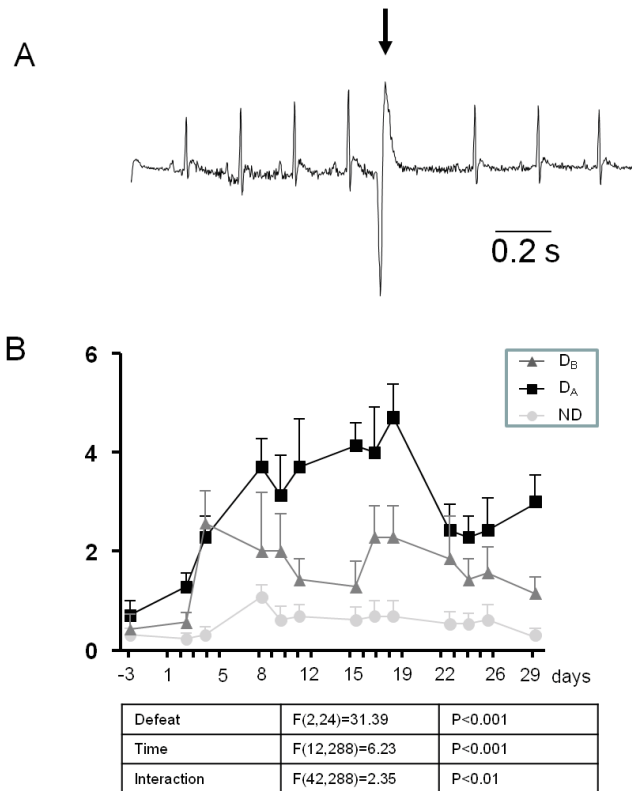
**Figure 7: Long-term effects of social defeat on heart rate in ND,  $D_A$  and  $D_B$  implanted with telemetric probes (Study II)**

Daily evolution of heart rate (HR) in ND,  $D_A$  and  $D_B$  rats, showing a group effect. Values are the mean $\pm$ SEM.



**Figure 8: Long-term effects of social defeat on arterial pressure in ND,  $D_A$  and  $D_B$  rats implanted with telemetric probes (Study II)**

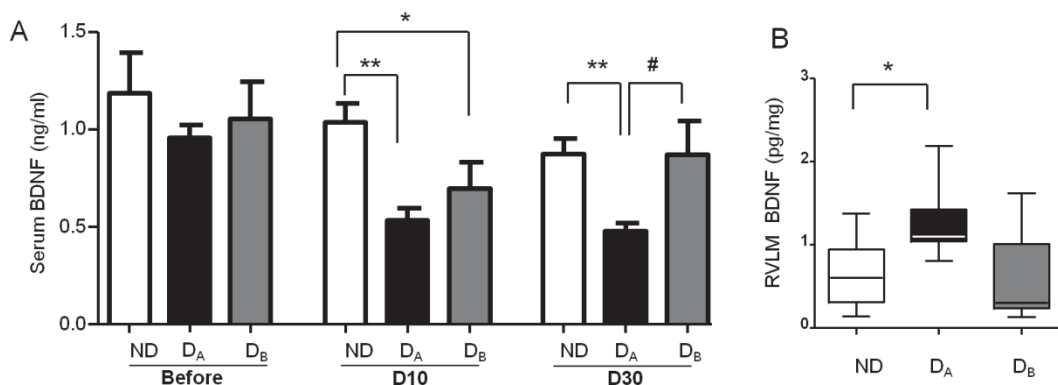
Daily evolution of mean arterial pressure (MAP, A), systolic arterial pressure (SAP, B) and diastolic arterial pressure (DAP, C) in ND,  $D_A$  and  $D_B$  rats, showing group effects. Values are the mean $\pm$ SEM.



**Figure 9: Long-term effects of social defeat on heart rhythm**

A- Representative examples of an ECG trace belonging to a  $D_A$  rat. Arrow : isolated ventricular ectopic beats.

B- Daily quantification of arrhythmic events (ventricular ectopic beats), showing group and interaction effects. Values are the mean $\pm$ SEM.



**Figure 10: Serum and RVLM BDNF changes induced by social defeat in ND,  $D_A$  and  $D_B$  rats implanted with telemetric probes (Study II)**

A- Serum BDNF levels before (D-3), and after (D10 and D30) the social defeat procedure. BDNF values were similar between groups at D-3. However, BDNF decreased in  $D_A$  and  $D_B$  rats at D10, and recovered only in  $D_B$  rats at D30. Values are the mean $\pm$ SEM. \*\* $p<0.01$  vs ND, #  $p<0.01$  vs  $D_B$ .

B- BDNF in RVLM was higher in  $D_A$  than ND and  $D_B$  rats at D30. Box-Whisker graphs with min and max values, lines are the medians. \* $p<0.05$  vs ND.

**Table 1 : The frequency domain features of HRV**

	ND	D	p
<b>LF (ms<sup>2</sup>)</b>	<b>0.69±0.13</b>	<b>0.94±0.11</b>	<b>0.03</b>
HF (ms <sup>2</sup> )	7.7±0.3	8.0±0.8	0.62
<b>LF/HF</b>	<b>0.079±0.006</b>	<b>0.151±0.018</b>	<b>&lt;0.001</b>
LF+HF	9.2±1.5	8.4±0.7	0.60
<b>LFnu</b>	<b>8.41±0.84</b>	<b>12.53±1.21</b>	<b>0.009</b>
<b>HFnu</b>	<b>91.59±0.84</b>	<b>87.47±1.21</b>	<b>0.009</b>

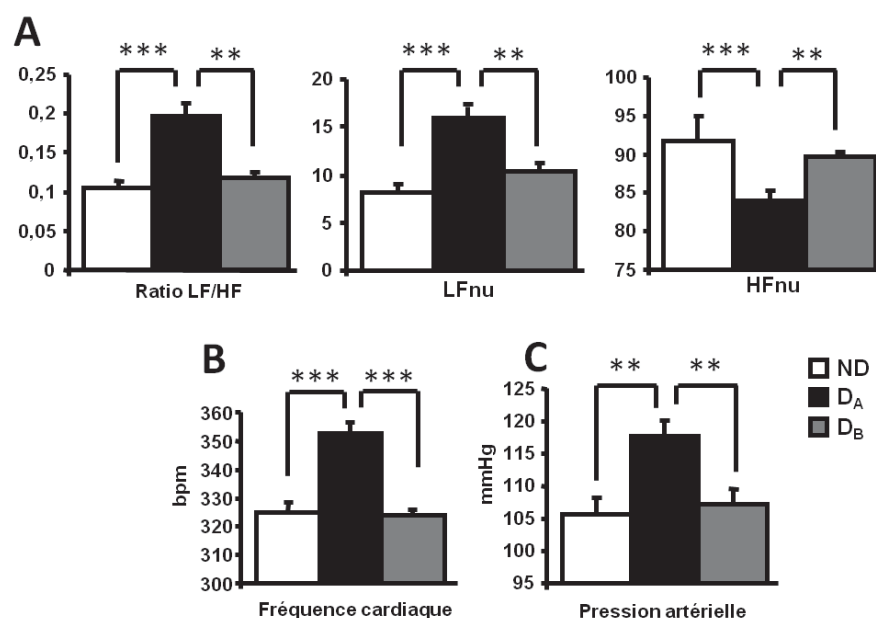
*LF* power of low-frequency band, *HF* power of high-frequency band, LFnu normalized LF power, HFnu normalized HF power

## Résultats complémentaires

Cette section présente des données s'inscrivant dans la problématique présentée dans l'étude I mais non incluses dans les publications.

### 1°) Différenciation des sous-populations D<sub>A</sub> et D<sub>B</sub> à D10 chez le rat anesthésié

Les données collectées en télémétrie et présentées au sein de l'Article n°2 ont révélé des différences au sein des divers paramètres cardiovasculaires mesurés chez les rats stressés. En effet, deux sous-populations ont pu être identifiées à long terme après la défaite sociale (D30) et l'analyse rétrograde de ces paramètres a mis en évidence une différence déjà présente à court terme à D10. Or, dans l'article n°1, les données des rats stressés sous anesthésie n'ont pas été séparées puisque la différence est plus évidente à D30 qu'à D10. Cependant, en reprenant les données cardiovasculaires de cet Article et en complétant avec des rats supplémentaires afin d'optimiser les effectifs de chaque sous-groupe D<sub>A</sub> et D<sub>B</sub>, nous avons pu catégoriser ces deux sous-groupes avec des différences significatives sur chaque paramètre mesuré : FC, PA, LFnu, HFnu et LH/HF. Ce dernier paramètre, tout comme à D30, est celui qui a servi à catégoriser les deux sous-populations chez les stressés. Ces résultats sont présentés dans les graphiques ci-dessous.

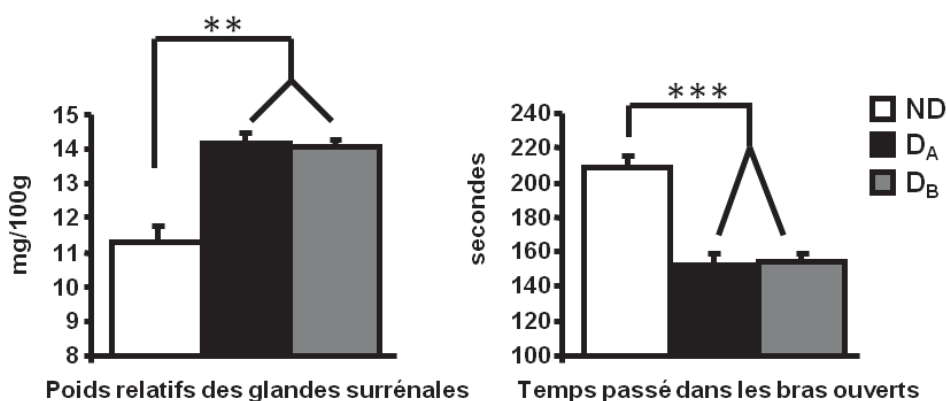


**Figure 22 : Différenciation des deux sous-populations des rats stressés sur la base de la VFC (A) obtenues sous anesthésie 5 jours après la fin de la défaite sociale (D10), et montrant une différence au niveau de la fréquence cardiaque (B) et de la pression artérielle (C)**

\*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001

Nous avons pu mettre en évidence qu'effectivement, deux sous-populations pouvaient être observées dès D10, dont une qui présente des paramètres cardiovasculaires modifiés (et correspondant donc au groupe D<sub>A</sub>) et l'autre non (groupe D<sub>B</sub>).

A la suite de cette différenciation entre D<sub>A</sub> et D<sub>B</sub>, nous avons regardé le profil de type anxieux au sein de ces deux sous-populations de rats stressés à D10. Comme le montre la **Figure 23**, aucune différence n'est observable entre les rats D<sub>A</sub> et D<sub>B</sub>, qui présentent tous les deux un phénotype de type anxieux. En effet, au sein des deux sous-groupes, le poids des glandes surrénales est augmenté dans les deux groupes de rats, et les rats D<sub>A</sub> et D<sub>B</sub> passent moins de temps dans les bras ouverts du test de l'Elevated Plus Maze par rapport aux rats contrôles. Par conséquent, même si tous les rats stressés présentent un phénotype de type anxieux, seuls certains d'entre eux présentent des paramètres cardiovasculaires perturbés.

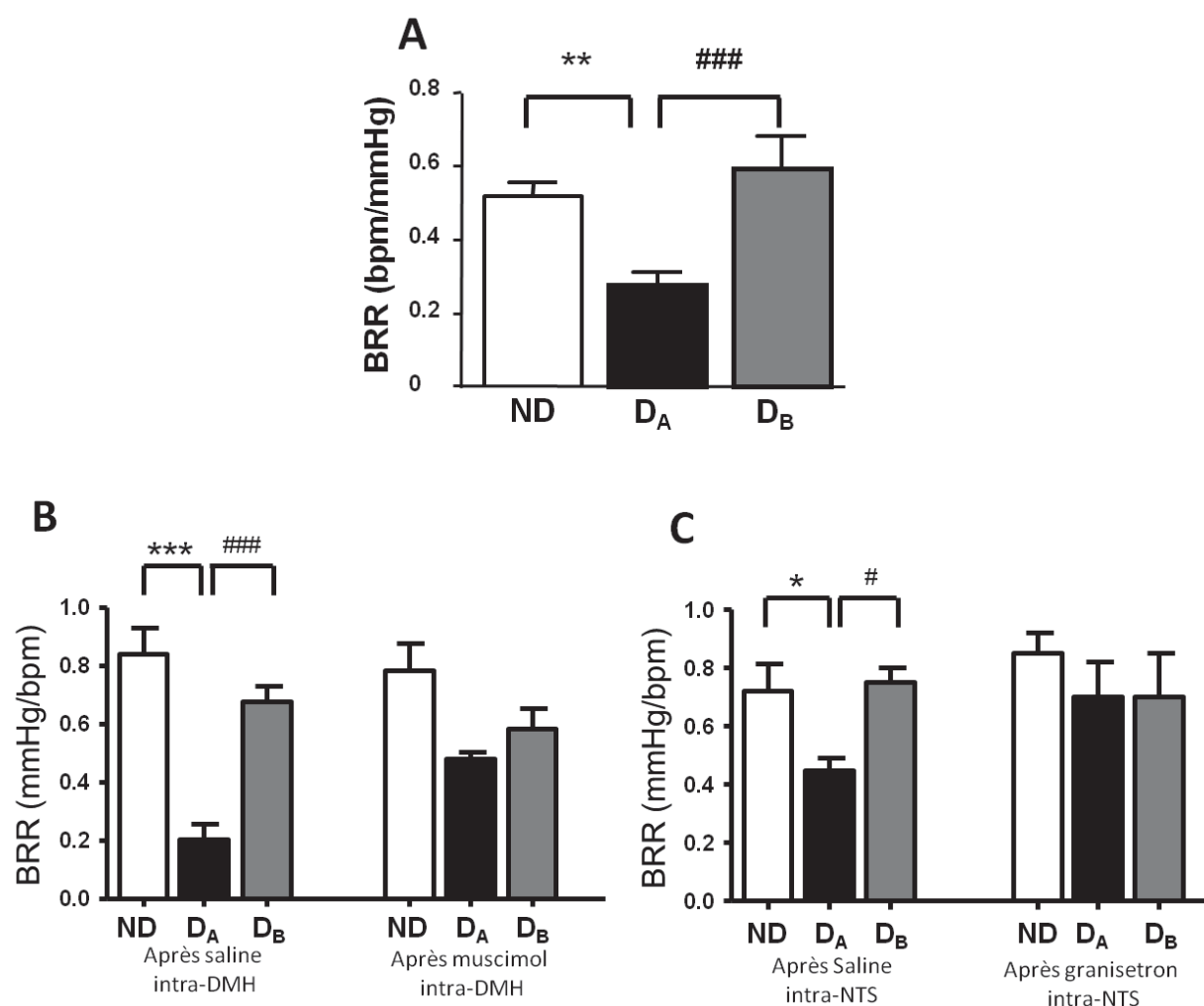


**Figure 23 :** Evaluation du phénotype de type anxieux à D10

## **2°) Sensibilité du baroréflexe à D30 et implication du DMH et des récepteurs 5-HT<sub>3</sub> du NTS**

L'activation des récepteurs 5-HT<sub>3</sub> du NTS, après microinjection d'un agoniste spécifique tel que la m-chlorophenylbiguanide, ou à la suite d'un stress aigu qui implique la stimulation du DMH, induit l'inhibition du baroréflexe cardiaque. Or nous avons montré dans l'Article n°1 que l'inhibition du baroréflexe cardio-vagal résultait aussi de l'activation de ce circuit neuronal après un stress chronique (D10). L'implication de ce circuit à D30 est présentée dans ces résultats complémentaires. Ainsi, nous avons mesuré dans un premier temps la sensibilité du baroréflexe chez les rats stressés et anesthésiés, ainsi que l'implication des récepteurs 5-

HT<sub>3</sub> du NTS et du DMH par microinjection respectivement de granisetron et de muscimol. Les résultats présentés ci-dessous montrent des résultats semblables à ce qui était observé dans l'Article n°1. En effet, à D30, on observe bien une inhibition du baroréflexe cardio-vagal obtenu par l'administration de phényléphrine, chez une partie des rats stressés classés dans la catégorie D<sub>A</sub>. Les rats D<sub>A</sub> ont été préalablement différenciés des autres rats stressés (D<sub>B</sub>) sur la base du rapport LF/HF. Ainsi, les rats D<sub>A</sub> présentent une hyperactivité sympathique persistante (LF/HF élevé, voir données dans l'Article n°2) associée à une inhibition de la composante cardio-vagale du baroréflexe (Figure 24A, BRR, ND = 0,51±0,04 ; D<sub>A</sub> = 0,27±0,03; D<sub>B</sub> = 0,59±0,09; p<0.01). Les microinjections de muscimol dans le DMH et de granisetron dans le NTS ont réversé cette inhibition (Figure 24B et C).

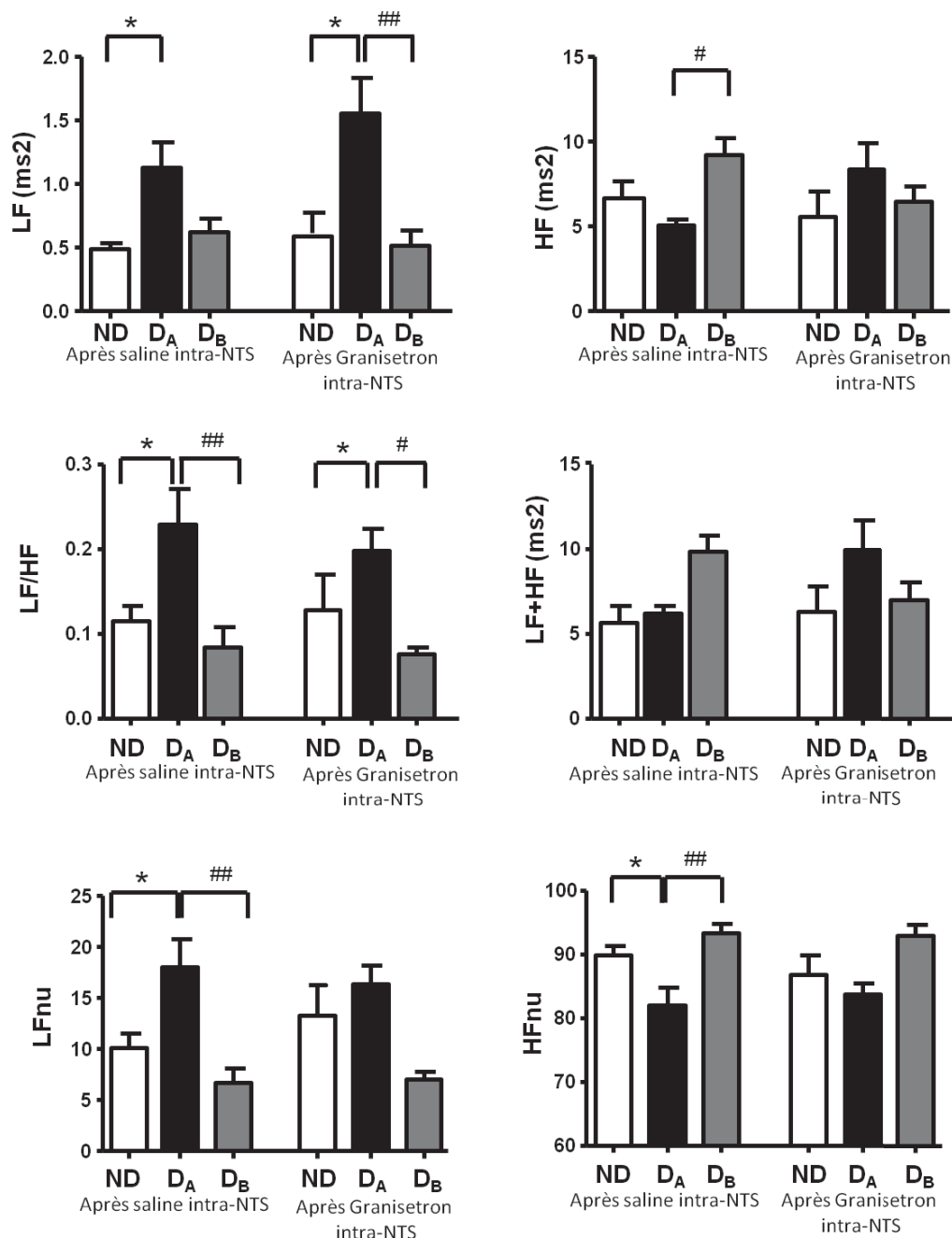


**Figure 24 :** Inhibition à long terme (D30) du baroréflexe (A) et effet des microinjections de muscimol dans le DMH (B) ou de granisetron dans le NTS (C)

Egalement, le blocage des récepteurs 5-HT<sub>3</sub> du NTS par microinjection de granisetron prévient la baisse du tonus parasympathique (les paramètres HF et HFnu diminués après

injection de solution physiologique dans le NTS remontent après granisetron, **Figure 25**) mais pas l'hyperactivité sympathique puisque le rapport LF/HF reste élevé (**Figure 25**).

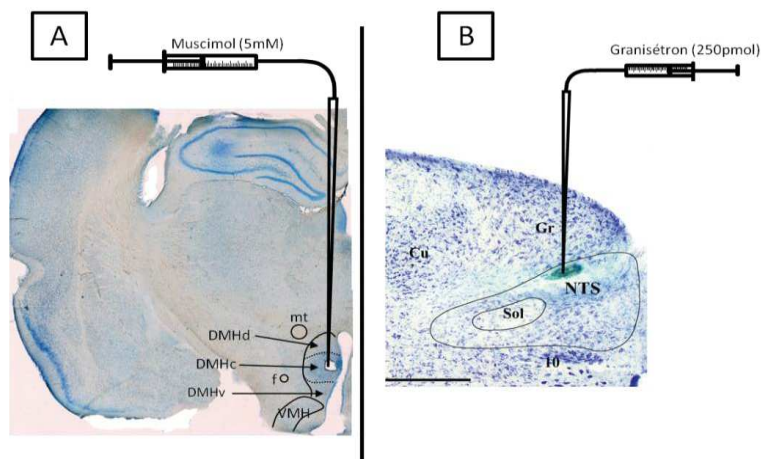
Les mécanismes centraux à l'origine des perturbations cardiovasculaires sont donc semblables à D10 et à D30 chez les rats  $D_A$ .



**Figure 25 :** Effet des microinjections de granisetron dans le NTS sur la VFC

### **3°) Localisation des microinjections centrales**

La localisation des microinjections effectuées dans le DMH et le NTS ont été vérifiées par histologie (Voir Matériel et méthodes, VI)). Un exemple est présenté dans la figure ci-dessous. Seules les données des rats dont les microinjections sont localisées dans les structures d'intérêts ont été sélectionnées.



**Figure 26 : coupes histologiques montrant la localisation des microinjections réalisées**

#### **(A) dans le DMH et (B) dans le NTS**

(A) coupe à -3.0 mm en arrière de Bregma. (B) : coupe à -14.4 en arrière de Bregma

DMHd : partie dorsale du DMH

DMHc : partie caudale du DMH

DMHv : partie ventrale du DMH

VMH : noyau ventromédian de l'hypothalamus

f : fornix

mt : tractus mamillothalamique

Cu : Noyau Cuneate

Gr : Noyau Gracilis

Sol : Faisceau du noyau solitaire

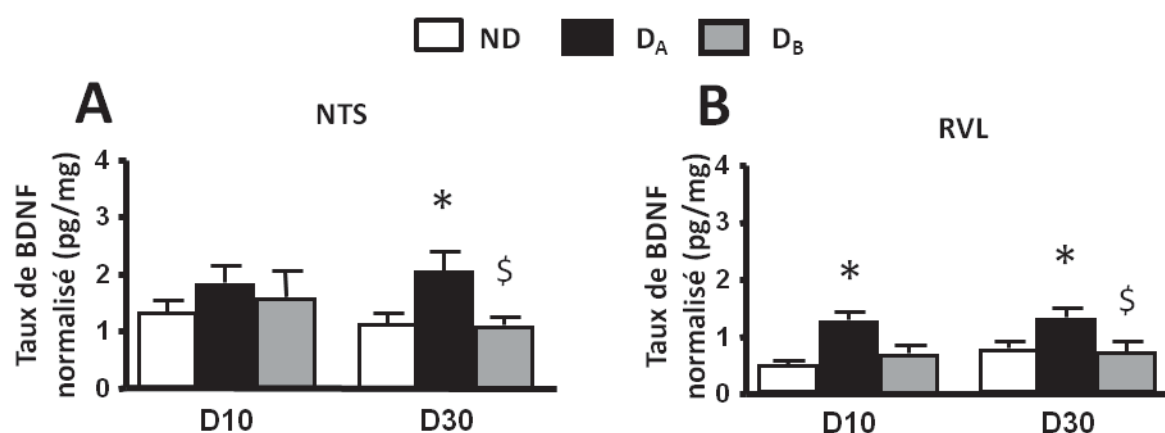
10 : noyau moteur du nerf vague

### **4°) Dosage du BDNF protéique dans le NTS et la RVL chez le rat**

Dans une étude de notre 1<sup>er</sup> laboratoire, l'expression du BDNF est modifiée dans une population de rats vulnérables à la dépression suite au stress social (Blugeot et al. 2011). Au sein de l'Article n°2, nous avons montré que le BDNF était effectivement diminué de façon persistante chez les rats D<sub>A</sub>, par rapport aux rats D<sub>B</sub>. De plus, nous avons montré une augmentation significative du BDNF dans la RVL à D30 chez les rats D<sub>A</sub> (Figure 27B). Le BDNF a également été dosé par méthode ELISA à D10 dans cette structure et on s'aperçoit que l'augmentation est déjà significative à ce stade post-stress par rapport aux rats contrôles ND (Figure 27B ; ND=0,45±0,06 vs D<sub>A</sub>=1,22±0,16 pg/mg, p<0.05). Les deux sous-groupes de rats stressés D<sub>A</sub> et D<sub>B</sub> ne sont pas significativement différents mais une tendance nette à



l'augmentation chez les rats  $D_A$  par rapport aux rats  $D_B$  apparaît ( $D_B=0,68\pm0,12$  vs  $D_A=1,22\pm0,16$  pg/mg,  $p=0,07$ ). Dans le NTS, les résultats présentés ci-dessous (Figure 27A) montrent également une augmentation uniquement chez les rats  $D_A$  et uniquement à long terme (D30,  $ND=1,11\pm0,17$  vs  $D_A=2,02\pm0,33$  pg/mg,  $p<0,05$  ;  $D_B=1,06\pm0,15$  vs  $D_A=1,22\pm0,16$  pg/mg,  $p<0,05$ ).



**Figure 27 : Taux de BDNF protéique normalisé par rapport au poids du tissu prélevé dans le NTS à différents stades post-stress (D10 et D30)**

\*  $p<0,05$  ND vs  $D_A$

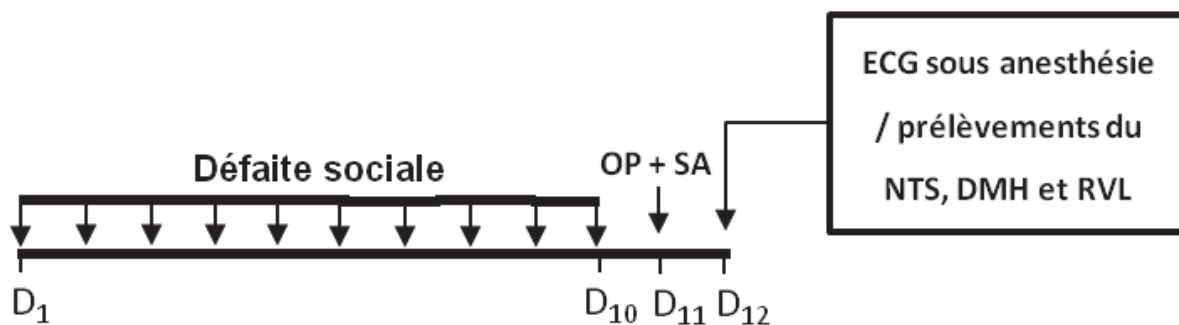
\$  $p<0,05$   $D_A$  vs  $D_B$

Le stress social est donc associé à une augmentation de l'expression de BDNF dans la RVL, mais aussi dans le NTS.

### **5°) Etude des paramètres cardiovasculaires et de l'expression de l'ARNm de certaines protéines d'intérêt chez la souris ayant un phénotype de type dépressif**

A la suite des observations obtenues chez le rat présentant un phénotype de type anxieux, nous avons reproduit l'analyse des paramètres cardiovasculaires chez la souris mais cette fois à partir d'un modèle induisant un phénotype de type dépressif (Voir protocole Figure 28). Les souris stressées C57BL/6J ont subi un protocole de défaite sociale basé également sur l'anticipation, mais qui a duré 10 jours. Le lendemain du 10<sup>ème</sup> et dernier jour de confrontation, deux tests comportementaux ont été appliqués : l'Open Field et l'interaction sociale. Au lendemain des tests comportementaux, l'ECG a été enregistré chez les souris stressées et témoins anesthésiées, afin d'y extraire la FC et la VFC. Sur un autre pool de souris ayant subi la défaite sociale, le NTS, le DMH et la RVL ont été prélevés afin d'y évaluer

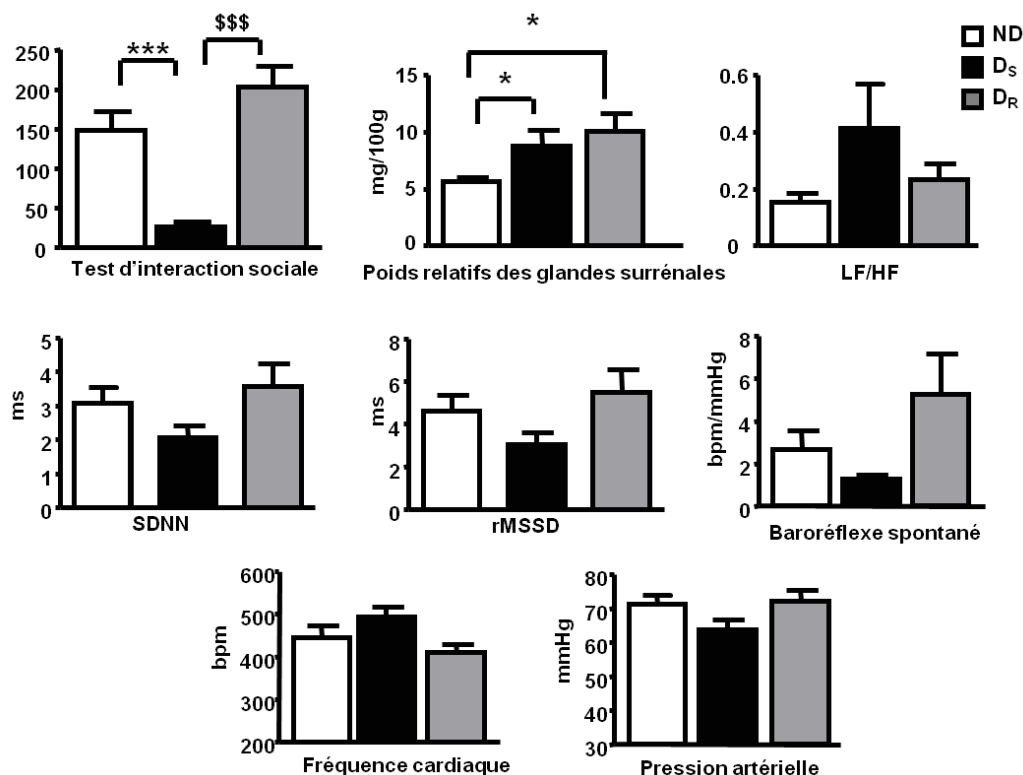
l'expression de certains ARNm d'intérêt. Enfin, à la fin du protocole, les glandes surrénales ont été prélevées, dégraissées et pesées afin d'évaluer l'activité de l'axe HHS.



**Figure 28:** Protocole de défaite sociale chez la souris

**Le test d'interaction sociale** a permis de catégoriser les souris stressées présentant un phénotype de type dépressif, dites sensibles au stress et appelées  $D_S$ , et les souris stressées ne présentant pas de phénotype de type dépressif, dites résistantes au stress et appelées  $D_R$ . Nous avons constaté que l'effet du stress est présent chez ces deux populations malgré un phénotype différent. En effet, le poids des glandes surrénales est élevé aussi bien chez les  $D_S$  que chez les  $D_R$  (Figure 29;  $ND=5,69\pm0,33$  ;  $D_S=8,79\pm1,36$  ;  $D_R=10,06\pm1,62$  ;  $p<0,05$ ).

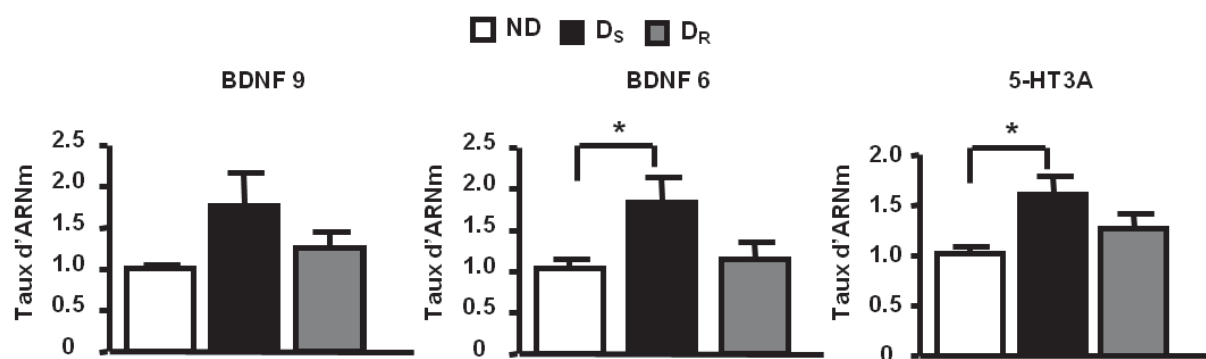
i) Paramètres cardiovasculaires : A partir de là, nous avons regardé les paramètres cardiovasculaires et on a pu observer que les souris  $D_S$  présentent un ratio LF/HF plus élevé que dans la population  $D_R$  ( $ND=0,15\pm0,03$  ;  $D_S=0,41\pm0,16$  ;  $D_R=0,23\pm0,06$ ), ainsi qu'une diminution du rMSSD ( $ND=4,65\pm0,69$  ;  $D_S=3,06\pm0,55$  ;  $D_R=5,49\pm1,09$ ) et du SDNN ( $ND=3,07\pm0,46$  ;  $D_S=2,07\pm0,33$  ;  $D_R=3,57\pm0,58$ ). Le baroréflexe spontané semble également être inhibé ( $ND=2,69\pm0,87$  ;  $D_S=1,26\pm0,16$  ;  $D_R=5,24\pm1,91$  bpm/mmHg) (Figure 29).



**Figure 29 : Catégorisation des souris sensibles D<sub>S</sub> et résistantes D<sub>R</sub> au stress à partir du test d'interaction sociale et analyse des paramètres cardiovasculaires chez ces deux populations**

Cependant, ces différences, qui vont dans le mêmes sens que les données collectées dans les études portant sur le rat, ne sont pas significatives, l'augmentation des effectifs est donc indispensable. De même, aucune modification au niveau de la PA et de la FC n'a été constatée chez ces souris, sans doute à cause du petit effectif observé. Il serait intéressant de voir à plus long terme après la fin de la défaite sociale, sachant que dans ce modèle le phénotype de type dépressif perdure jusqu'à 4 semaines, si les différences entre D<sub>S</sub> et D<sub>R</sub> sont plus marquées, et si le DMH et le NTS sont impliqués dans ces effets.

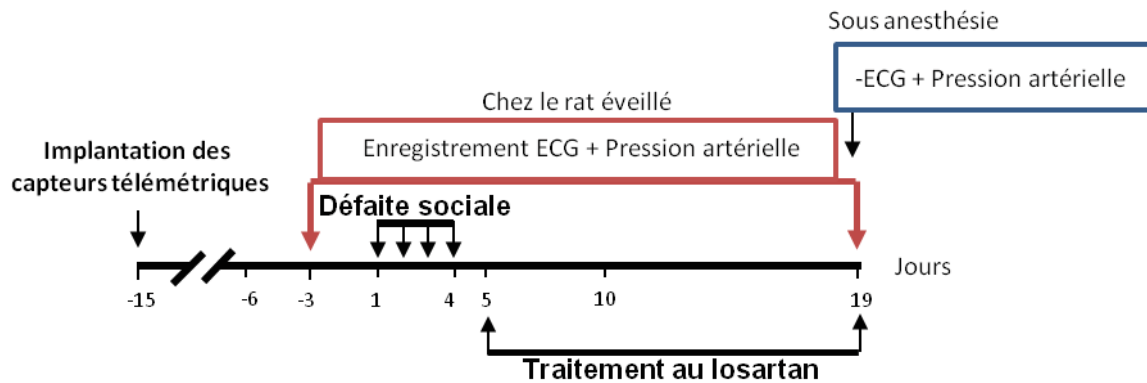
ii) Expression des ARNm du BDNF et des récepteurs 5-HT<sub>3</sub> : En parallèle, sur un autre pool de souris, le niveau d'expression d'ARNm d'intérêt a été mesuré par qRT-PCR. Dans le NTS, le taux de BDNF est augmenté notamment concernant l'exon 6 ainsi que l'ARNm codant pour les récepteurs sérotoninergiques de type 3A (Figure 30). Cette augmentation n'est significative que chez les souris D<sub>S</sub> laissant supposer un rôle dans le phénotype de type dépressif ainsi que dans la modification des paramètres cardiovasculaires, notamment au niveau de l'inhibition du baroréflexe puisque le NTS y joue un rôle clé.



**Figure 30:** Dosage des ARNm par qRT-PCR dans le NTS. Evaluation du taux d'expression des ARNm du BDNF total (BDNF 9), du BDNF 6 et des récepteurs 5-HT<sub>3A</sub>

#### **6°) Effet du l'implication des récepteurs AT<sub>1</sub> chez le rat**

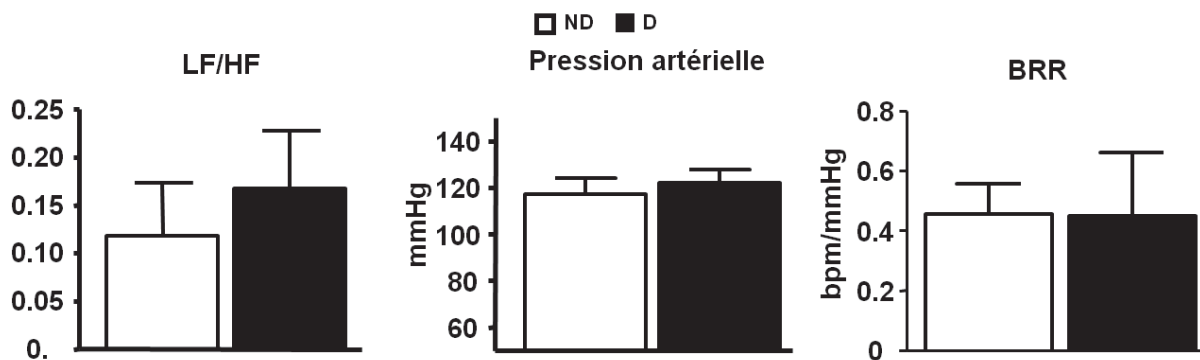
Le losartan est un antagoniste spécifique des récepteurs AT<sub>1</sub>, bloquant ainsi la plus grande partie des effets de l'angiotensine II puisque ces récepteurs sont responsables des effets majeurs de cette substance. Comme l'angiotensine II joue un rôle dans l'hypertension induite expérimentalement chez le rat et que le taux de BDNF dans la RVL s'en trouve augmenté (Chan et al. 2010), nous avons testé dans notre modèle l'effet du losartan, pour en observer l'effet sur l'hyperactivité sympathique développée chez les animaux stressés. Une série d'animaux a reçu un traitement chronique de losartan (par infusion osmotique) entre le 1<sup>er</sup> jour suivant la défaite sociale (D5) et D19 (Voir protocole ci-dessous Figure 31). Le protocole était semblable à celui de l'Article n°2 cohorte 2 puisque les rats ont été préalablement implantés avec un capteur de télémétrie. Nous avons arrêté le protocole avant la procédure habituelle, car les pompes ne diffusent leur produit que pendant 15 jours seulement. A D19, les rats ont donc été anesthésiés et les paramètres cardiovasculaires ont été analysés (FC, PA et VFC).



**Figure 31:** Protocole d'analyse des paramètres cardiovasculaires en télémétrie et sous anesthésie avec le traitement au losartan

Il est à noter que cette série comportait un petit effectif d'animaux seulement, ND : n=4, et D : n=4).

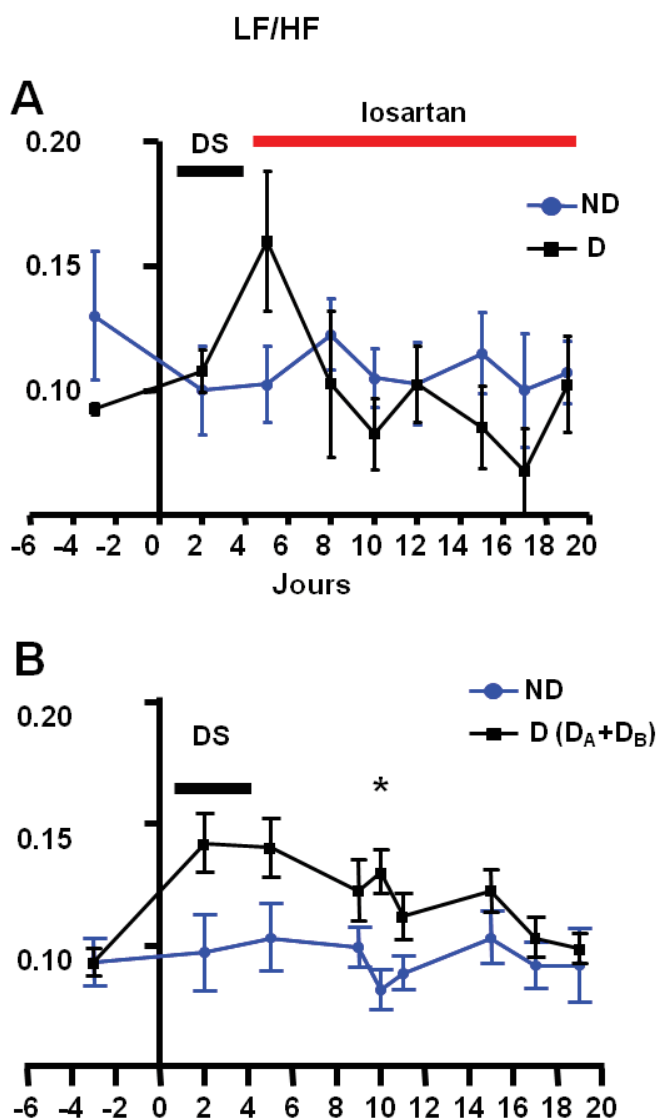
Nous n'avons pu classer les rats stressés en sous-groupes D<sub>A</sub> ou D<sub>B</sub> car le ratio LF/HF à D19, enregistrés après anesthésie, était bas chez tous les animaux et nous les avons donc regroupés sous le terme D. Aucune différence entre rats stressés (D) et rats contrôles (ND) n'a été trouvée à la suite de ce traitement chronique au losartan sur le ratio LF/HF, la PA et le baroréflexe (BRR) (Figure 32).



**Figure 32:** Effet du traitement au losartan sur le ratio LF/HF, la pression artérielle moyenne et le baroréflexe pharmacologique (BRR) mesuré sous anesthésie à D19

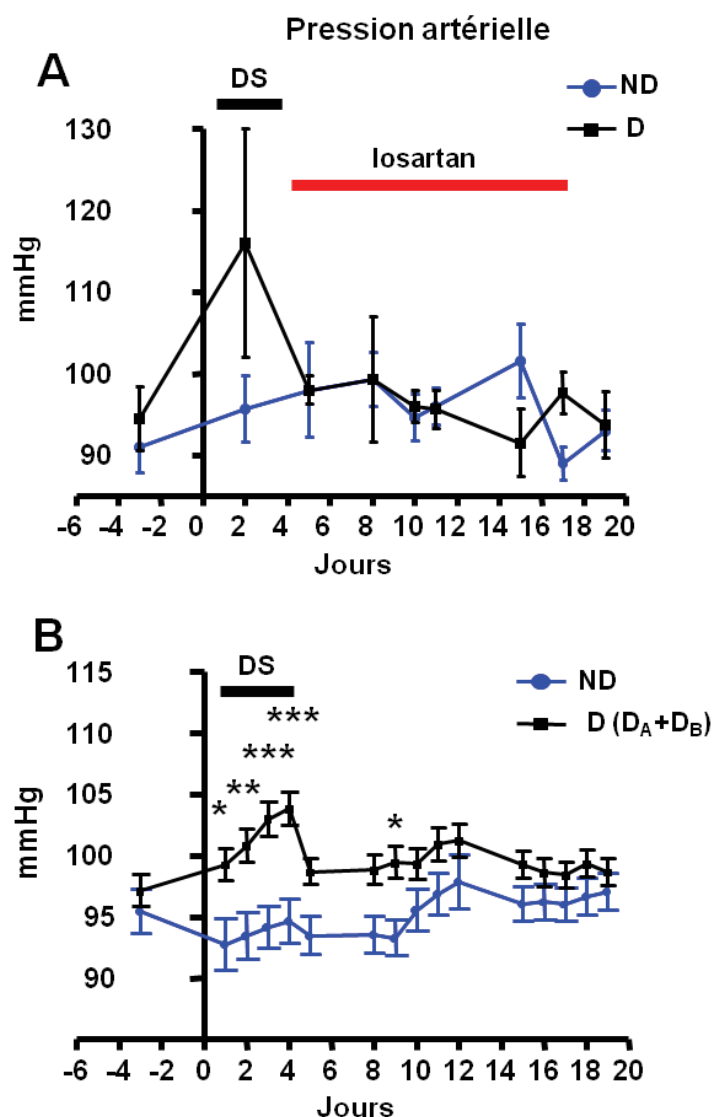
L'analyse télémétrique du ratio LF/HF après losartan a montré que ce paramètre était bien augmenté de D2 à D4 (pendant la défaite sociale) chez l'ensemble des rats stressés (rats D) (Figure 33A). Mais dès D5, le ratio LF/HF chez les rats D a diminué fortement pour se rapprocher dès lors des rats témoins. L'analyse post-hoc Bonferroni montre qu'il n'y a pas de différence entre rats ND et D de D5 à D19.

Nous n'avons pu réaliser cette expérience avec de la solution physiologique. Pour comparer ce résultat avec des rats « contrôles », nous avons regroupé les rats D<sub>A</sub> et D<sub>B</sub> des données de l'Article 2 (Cohorte 2) en rats D. Chez ces animaux, si les rats D avaient un ratio LF/HF élevé par rapport aux rats ND entre D2 et D5, cette différence perdurait notamment jusqu'à D10 (Figure 33B, ND=0,09±0,01 vs D=0,12±0,01 ; p<0.05).



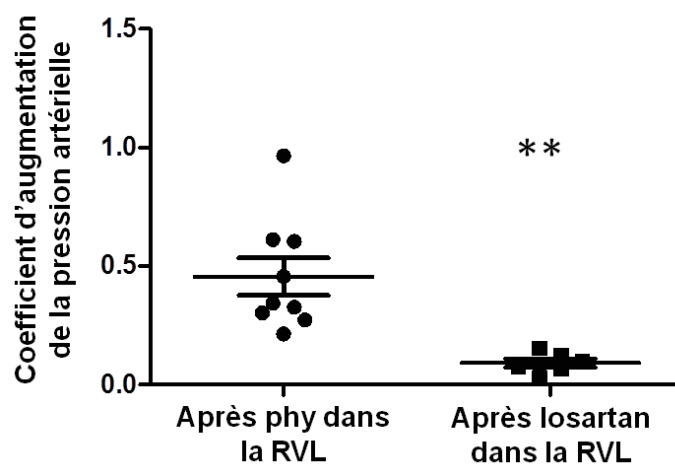
**Figure 33:** Effet du traitement au losartan sur le ratio LF/HF mesuré en télémétrie

Les mêmes observations ont été constatées sur la PA moyenne où l'on a une augmentation forte au moment de la défaite sociale (DS) sur les deux cohortes (avec traitement au losartan (Figure 34A) et sans traitement (Figure 34B), mais aucune différence n'est observable après D9 dans la cohorte avec losartan ( $ND=97\pm5$  vs  $D=105\pm2$ ), alors que l'on constate bien une PA moyenne toujours significativement élevée à D9 ( $ND=93\pm1$  vs  $D=99\pm1$  ;  $p<0.05$ ) dans la cohorte sans traitement.



**Figure 34:** Effet du traitement au losartan sur la pression artérielle moyenne mesurée en télémétrie

Ainsi, nous pouvons émettre l'hypothèse au vu de ces résultats préliminaires de l'implication de l'angiotensine II dans le déséquilibre du SNA en faveur d'une hyperactivité sympathique, dont l'origine est probablement l'activation chronique du DMH. Ceci est à rapprocher d'un autre résultat que nous avons obtenu. En effet, sur des rats anesthésiés n'ayant subi aucun stress, nous avons réalisé des études pharmacologiques afin d'étudier plus précisément le rôle du losartan au niveau de la RVL. En mimant un stress aigu par l'activation pharmacologique du DMH (microinjection de bicuculline [5mM] pour désinhiber cette structure), la PA augmente (augmentation de  $30 \pm 4$  mmHg à partir d'une PA basale de  $80 \pm 5$  mmHg). Cela fait partie intégrante de la réaction de défense qui s'accompagne également d'une augmentation de la FC. Sur la Figure 35, on observe que l'administration préalable de losartan intra-RVL réduit fortement l'augmentation de la PA induite par la stimulation du DMH. En effet, le coefficient d'augmentation ( $\Delta PA/\text{Baseline}$ ) passe de  $0,46 \pm 0,08$  mmHg à  $0,09 \pm 0,02$  mmHg.



**Figure 35:** Augmentation de la pression artérielle par stimulation chimique (bicuculline) du DMH après injection soit d'une solution physiologique soit de losartan dans la RVL



## CONCLUSION de l'étude I

L'ensemble des résultats présentés dans ce mémoire faisant l'objet d'une discussion globale dans le chapitre « Discussion générale et perspectives », nous nous focaliserons ici à résumer les principales conclusions concernant les questions qui nous ont amené à réaliser les études présentées dans ces deux Articles.

Les résultats rapportés dans l'article 1 montrent que le modèle de défaite sociale utilisé a bien un impact massif sur l'axe du stress. En effet, la défaite sociale cause, cinq jours après (D10), un phénotype de type anxieux (Elevated Plus Maze) et une hyperactivité de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien (HHS). On constate également en parallèle des modifications autonomiques et cardiovasculaires similaires à celles retrouvées chez les patients anxieux. En effet, les rats stressés présentaient à D10 une hyperactivité sympathique (rapport LF/HF augmenté), une baisse du tonus parasympathique (rMSSD diminué) et une diminution de la sensibilité du baroréflexe cardio-vagal. De plus, le traitement anxiolytique appliqué dès la fin de la procédure de stress a réversé toutes ces modifications ainsi que le profil de type anxieux. Ce modèle répond donc au trois caractéristiques d'homologie, d'isomorphisme et de prédiction. L'exploration des mécanismes centraux responsables de ces altérations a montré que ces mécanismes étaient similaires à ceux impliqués dans la réaction de défense. L'inhibition du DMH par le muscimol chez l'animal anesthésié à D10 a permis de retrouver un équilibre sympathovagal et un baroréflexe normal. Quant au blocage des récepteurs 5-HT<sub>3</sub> du NTS par administration locale ou systémique de granisétron, cela a permis de restaurer uniquement la composante cardio-vagale du baroréflexe mais pas l'hyperactivité sympathique. **Ceci suggère donc deux circuits distincts ayant pour origine le DMH avec sans doute 1/ une voie d'activation direct du tonus sympathique et 2/ une action vers le NTS par le biais de libération de sérotonine inhibant le baroréflexe. Un circuit théorique sera exposé dans la discussion.**

L'étude figurant dans l'Article 2 a tout d'abord permis de voir à plus long terme la persistance ou non de ces altérations autonomiques et cardiovasculaires. On distingue deux sous-populations chez les rats stressés et sous anesthésie 25 jours après la fin de la défaite sociale (D30): l'une où on retrouve les mêmes altérations autonomiques et cardiovasculaires observés à D10 (rats D<sub>A</sub>) et l'autre où ces paramètres sont similaires à ceux retrouvés chez les animaux contrôles (rats D<sub>B</sub>). Il est important de noter que l'évaluation du profil anxieux a révélé que

les deux populations de rats ayant subi la défaite sociale ne présentaient plus de phénotype de type anxieux à ce stade (D30). **Ainsi, ces résultats montrent qu'un phénotype anxieux, même lorsqu'il a disparu, peut avoir des répercussions à long terme sur le système cardiovasculaire chez une catégorie d'individus, et qu'il y a donc une « trace » persistante laissée par le stress répété, même de courte durée.**

Des microinjections de muscimol dans le DMH et de granisetron dans le NTS ont également été réalisées à la fin du protocole (D30). Les résultats indiquent tout comme à D10 que le DMH est suractivé et que l'activation des récepteurs 5-HT<sub>3</sub> du NTS est responsable de l'inhibition de la composante cardio-vagale du baroréflexe uniquement chez la sous-population de rats stressés ayant des altérations cardiovasculaires persistantes.

Les enregistrements télémétriques ont permis de compléter ce qui est observé sous anesthésie à D10 et D30, en permettant de voir l'évolution journalière de la différenciation entre les deux sous-populations de rats stressés. De façon très intéressante, il apparaît que les deux populations discriminées à D30 par leur ratio LF/HF sont déjà différenciables à D10. Nous avons donc repris les données figurant dans l'Article 1 afin de voir si l'on pouvait distinguer ces deux populations à D10 sous anesthésie et nous avons rajouté certains effectifs (Résultats complémentaires). En effet, les données des rats stressés étant dispersées, nous avons pu les séparer en deux sous-populations. Les différents paramètres cardiovasculaires sont significativement différents entre les deux pools de rats stressés une fois séparés, à savoir une FC élevée, une hypertension et un rapport LF/HF haut.

D'un point de vu anatomo-morphologique, il semblait que la défaite sociale n'induisait que peu d'altérations au niveau du muscle cardiaque (Carnevali et al. 2012). Or grâce à l'identification de deux sous-populations par le ratio LF/HF, nous avons pu montrer qu'en fait les rats D<sub>A</sub> présentent une hypertrophie cardiaque à D30 (avec apparemment une hypertrophie ventriculaire gauche même si celle-ci n'apparaît pas significative). Les enregistrements en télémétrie ont aussi révélé que les rats D<sub>A</sub> présentent un nombre d'arythmies quotidien plus important suite à la défaite sociale que les rats D<sub>B</sub>. Les arythmies ventriculaires semblent être d'origine sympathique (Thireau et al. 2014), mais une étude a montré que des rats hyperanxieux présentaient ce type d'arythmie en relation avec une activité vagale réduite (Carnevali et al. 2013). Nous pouvons supposer que la susceptibilité des rats D<sub>A</sub> de développer des arythmies ventriculaires découle de la dysfonction autonome sympathique et parasympathique à long terme présente chez ces animaux. Toutes ces altérations morphologiques et physiologiques correspondent à celles obtenues dans une lignée d'animaux

hyperanxieuse (Carnevali et al. 2013). **La « trace » laissée plus particulièrement chez les rats D<sub>A</sub> indique qu'ils auraient une sensibilité particulière à l'anxiété.**

Les résultats récents obtenus sur ce même modèle de défaite sociale au sein de mon 1<sup>er</sup> laboratoire d'accueil ont montré que ce modèle induisait chez une partie des rats stressés, dits vulnérables à la dépression (car ils déclenchent un profil dépressif à la suite de l'application d'un stress mineur), des variations au niveau du taux de BDNF dans certaines structures centrales. C'est notamment le cas au niveau de l'hippocampe, où une baisse du BDNF a été observée et ceci en relation avec des modifications neuroanatomiques telles qu'une diminution du nombre de dendrites (Blugeot et al. 2011). Nous avons donc mesuré le taux de BDNF dans le sang **et nous avons effectivement retrouvé un taux de BDNF bas, à D10 et D30, chez les rats D<sub>A</sub> uniquement.** Puis nous avons regardé le BDNF protéique dans certaines structures impliquées dans le contrôle cardiovasculaire par le SNA, à savoir le NTS et la RVL. Ces données révèlent une augmentation du taux de BDNF au sein de ces deux structures évoluant au cours du temps, chez les animaux D<sub>A</sub> par rapport aux animaux contrôles (ND) et D<sub>B</sub>. De façon très intéressante, l'augmentation est plus rapidement significative dans la RVL que dans le NTS, respectivement dès D10 et D30. Il semble donc exister une forte relation entre le BDNF dans ces structures et la persistance des altérations autonomiques et cardiovasculaires.

**Ainsi nos études permettent pour la première fois d'établir un lien entre individus vulnérables à la dépression et susceptibles de subir des événements cardiaques de type arythmie ventriculaire par le biais d'une hyperactivité sympathique associée à une réduction du tonus vagal.**

Nos études portant sur la souris semblent indiquer la même conclusion. En effet, les souris présentant un phénotype de type dépressif (D<sub>S</sub>) ont un ratio LF/HF qui a tendance à être augmenté ainsi qu'un baroréflexe réduit. Les récepteurs 5-HT<sub>3</sub> du NTS semblent également être impliqués dans ces modifications cardiovasculaires chez ces souris D<sub>S</sub>. En effet, une surexpression de ces récepteurs a été trouvée au niveau du NTS et les souris KO 5-HT<sub>3</sub> ne présentent plus de modifications cardiovasculaires. De plus, ces souris présentent aussi une augmentation du BDNF 6 au sein de la RVL et du NTS.

Au vue de la littérature actuelle, l'augmentation du BDNF dans la RVL pourrait indiquer la présence d'un stress oxydant dans cette structure, à l'origine de l'hypertension. En effet, outre son rôle neurotrophique, le BDNF joue un rôle de feedback négatif sur le stress oxydant et son expression est augmentée dès qu'il y a un fort taux d'anion superoxyde intracellulaire en vue de réduire ce stress oxydant (Chan et al. 2010). Chan et ses collaborateurs ont décrit la présence de ce stress oxydant dans la RVL, comme à l'origine d'une hypertension. L'angiotensine II, via les récepteurs AT<sub>1</sub>, semble être à l'origine d'un stress oxydant dans la RVL (Chan et al. 2010 ; de Oliveira-Sales et al. 2010). Nous avons donc émis l'hypothèse d'un rôle éventuel de l'angiotensine II au niveau de la RVL dans notre modèle de stress social, qui serait à l'origine de l'augmentation d'expression du BDNF. **Nous avons effectivement montré que le losartan dans la RVL réversait l'hyperactivité sympathique induite par la stimulation du DMH.** De plus, nous avons quelques résultats préliminaires sur une série de rats suivant le protocole de défaite sociale et implantés avec les capteurs télémétriques. Chez ces animaux vigiles, on constate bel et bien l'augmentation de la PA chez tous les rats stressés pendant la défaite sociale, mais **le traitement chronique au losartan (antagoniste des récepteurs AT<sub>1</sub> de l'angiotensine II) appliqué au lendemain de la défaite sociale et pendant 15 jours, diminue immédiatement la PA.**

De la même façon, un stress oxydant dans le NTS a été décrit expliquant le déficit vagal (et donc l'inhibition du baroréflexe) dans le transfert d'information vers le NA (Tsai et al. 2013). De plus, l'angiotensine II inhibe la composante cardio-vagale du baroréflexe via les récepteurs AT<sub>1</sub> du NTS ( Michelini and Bonagamba 1990; Casto and Phillips 1986 ; Paton and Kasparov 1999). De plus, dans un modèle animal d'hypertension induite par l'administration chronique d'angiotensine II, les rats présentent une altération du baroréflexe cardio-vagal à la suite d'une perturbation de la connectivité des neurones du NTS vers les neurones pré moteurs parasympathiques du noyau ambigu (NA) (Tsai et al. 2013). On peut donc penser que l'angiotensine II pourrait aussi être à l'origine de la surexpression du BDNF dans le NTS, via des récepteurs AT<sub>1</sub> locaux, pour bloquer le baroréflexe dans notre modèle de stress social. **Les résultats préliminaires utilisant le traitement chronique au losartan vont dans ce sens, puisque ce traitement réverse le blocage de la réponse cardiaque induite par la phényléphrine.** Ces résultats sont encourageants pour explorer le rôle de l'angiotensine II mais des séries supplémentaires sont nécessaires et des contrôles avec un placebo (eau physiologique) sont indispensables pour conclure.

Comme l'activation des récepteurs 5-HT<sub>3</sub> du NTS a aussi un tel effet sur le baroréflexe, ceci suggère qu'un circuit commun impliquant les récepteurs 5-HT<sub>3</sub> et AT<sub>1</sub> au niveau du NTS soit activé lors du stress social, pour induire une réduction du tonus vagal et du baroréflexe

**En conclusion, cette première étude répond donc au premier objectif. En effet, l'activation chronique du DMH et des récepteurs 5-HT<sub>3</sub> du NTS font partie des mécanismes impliqués dans l'hyperactivité sympathique persistante et dans l'inhibition cardio-vagale du baroréflexe pouvant expliquer la survenue d'arythmies et de l'hypertrophie cardiaque. Le rôle du BDNF et des récepteurs dans ces effets AT<sub>1</sub> sont envisagés.**

## **Etude II :**

### **Implication du DMH et des récepteurs 5-HT3 du NTS dans les modifications respiratoires induites par un stress chronique**

#### **Article n°3**

**Respiratory sinus arrhythmia as a surrogate measure of respiratory frequency: validity and robustness to activity in rats.**

Brouillard C, Carrive P, Similowski T, Sévoz-Couche C

J Appl Physiol, 118(2):238-43, 2015

#### **Article n°4**

**Chronic stress-induced anxiety-like state can lead to a long-lasting reduction in breathing frequency.**

Brouillard C, Carrive P, Camus F, De Boer SF, Bénoliel JJ, Similowski T, and Sévoz-Couche C. (J. Physiol, soumis)

#### **Résultats complémentaires**

## INTRODUCTION

Le stress et la respiration sont intimement liés et cette relation est bilatérale. Les pathologies respiratoires peuvent induire un stress et le stress aggrave d'autant plus la pathologie respiratoire. Les techniques de contrôle respiratoire ont montré des effets bénéfiques chez les patients atteints de troubles d'anxiété ou de dépression tout comme les techniques de relaxation ou de méditation basée sur la respiration. A l'inverse, le stress cause des réponses respiratoires telles qu'une hyperventilation. En condition de stress aigu et ponctuel, ces réponses sont normales mais peuvent devenir pathologiques si le stress est trop important. L'impact du stress chronique sur la respiration chez les patients anxiodépressifs est nettement moins étudié que sur le système cardiovasculaire. Cependant, les données cliniques indiqueraient une augmentation de la respiration chez les patients anxieux et à l'inverse une hypoventilation chez les patients dépressifs.

Nous avons donc étudié la variation de la fréquence respiratoire chez les rats soumis à la défaite sociale et ce à plus ou moins long terme après le stress (D10 et D30).

L'analyse fréquentielle de la VFC par la transformée de Fourier a permis d'extraire le pic ASR (*Arythmie sinusale respiratoire*) dans la bande de fréquence HF. Il est admis que la fréquence de ce pic est corrélée à la fréquence respiratoire (Pagani et al. 1986 ; Eckberg 1997). Dans un premier temps, nous avons vérifié cette corrélation sur des rats anesthésiés ou vigiles, et selon leur niveau d'activité locomotrice (Article n°3). Ceci a été fait en plaçant le cathéter de mesure de pression non pas dans l'aorte abdominale mais au niveau subpleural (par une approche le long de l'œsophage). Ce dispositif a permis d'enregistrer les mouvements respiratoires et la pression sous-pleurale, et donc avoir un enregistrement du cycle respiratoire afin d'en mesurer la fréquence

Puis, dans l'Article n°4, le pic ASR a été mesuré à D10 et D30 toujours chez des animaux anesthésiés, et l'implication du DMH et des récepteurs 5-HT<sub>3</sub> du NTS a pu être étudié à ces deux stades. Egalement, les enregistrements de l'ECG quotidien sur l'animal éveillé ont permis de mesurer le pic ASR et de voir son évolution quotidienne sous l'impact de la défaite sociale.

**Article n°3****Respiratory sinus arrhythmia as a surrogate measure of respiratory frequency: validity and robustness to activity in rats.**

Brouillard C, Carrive P, Similowski T, Sévoz-Couche C

J Appl Physiol, 118(2):238-43, 2015



# Respiratory sinus arrhythmia as a surrogate measure of respiratory frequency: validity and robustness to activity in rats

Charly Brouillard,<sup>1</sup> Pascal Carrive,<sup>5</sup> Thomas Similowski,<sup>2,3,4</sup> and Caroline Sévoz-Couche<sup>1</sup>

<sup>1</sup>CR-ICM, UPMC/INSERM, UMR-S 975, CNRS UMR 7225, Faculté de Médecine UPMC, Site Pitie-Salpêtrière, Paris, France; <sup>2</sup>Sorbonne Universités, UPMC Université Paris 06, UMR-S 1158, Neurophysiologie Respiratoire Expérimentale et Clinique, Paris, France; <sup>3</sup>INSERM, UMR-S 1158, Neurophysiologie Respiratoire Expérimentale et Clinique, Paris, France; <sup>4</sup>APHP, Groupe Hospitalier Pitie-Salpêtrière, Charles Foix, Service de Pneumologie et Réanimation Médicale (Département R3J), Paris, France; and <sup>5</sup>Blood Pressure, Brain and Behavior Laboratory, School of Medical Sciences, University of New South Wales, Sydney, New South Wales, Australia

Submitted 4 September 2014; accepted in final form 13 November 2014

**AQ:2 Brouillard C, Carrive P, Similowski T, Sévoz-Couche C.** Respiratory sinus arrhythmia as a surrogate measure of respiratory frequency: validity and robustness to activity in rats. *J Appl Physiol* 118: 000–000, 2015. First published November 20, 2014; doi:10.1152/japplphysiol.00799.2014.—Recording of breathing frequency is a basic requirement for respiratory physiology. Usual techniques are invasive and constraining. Respiratory sinus arrhythmia (RSA) has recently been demonstrated to be a simple way to obtain respiration frequency at rest. In this study, we investigated whether this correlation is also observed during activity. We first compared RSA to the respiration frequency obtained in anesthetized rats using a pneumotachograph connected to the trachea (TRF). Data analyses using Passing and Bablok regression confirmed the absence of bias and proportional differences. Accordingly, the Bland-Altman plot did not show any significant differences in data sets. In a second experiment, we compared RSA to the respiration frequency obtained in freely moving rats using a subpleurally inserted telemetric catheter (PRF). Comparisons between RSA and PRF revealed no significant difference in determination of respiratory rate with the two methods, although the bias and confidence interval were greater when activity increased. This was, however, not the case during short episodes of sniffing-like tachypnea, during which no matching RSA peaks were observed. In conclusion, RSA frequency reflected regular respiration frequency independently of the level of activity and appears to be a good surrogate to usual techniques.

heart rate variability; RSA; respiratory frequency; vigilance; method

RECOGNITION OF ALTERATIONS in tidal volume and respiration pattern is an important early clue to disease detection. In particular, careful observation of the respiratory frequency is a crucial part of physical examination. Respiratory function in humans is usually evaluated by using a plethysmograph chamber (the whole body is placed in a sealed box) or a pneumotachograph device (measurement of chest wall displacement). Both techniques can also be performed in conscious (3) or anesthetized (16) animals, respectively. However, these techniques are either invasive or constraining, and they do not allow measurement of the respiratory rate for extended period of time or during periods of behavioral activity. The heart rate (HR) time series is characterized by a wide range of beat-to-beat variability. Parasympathetic (vagal) influences are present throughout all frequency ranges of the HR power spectrum, while sympathetic influences disappear

at higher frequencies (7). It is therefore commonly accepted that the HR power spectrum contains two major components: high frequency (HF), which reflects cardiac vagal tone, and low frequency (LF), which reflects a mixture of parasympathetic and sympathetic influences. Respiratory sinus arrhythmia (RSA) reaches a peak in the HF domain (15). It reflects afferents to cardiac vagal motoneurons from lung stretch receptor and respiratory central pattern generators (located in the lower brainstem) (12). RSA is the heart pattern that occurs when HR increases during inhalation and decreases during exhalation and can be interpreted as influences of respiration on the sinoatrial node of the heart (9). It is therefore characterized by periodic increases and decreases in HR that occur at a frequency similar to that of respiration. RSA is derived from electrocardiogram (ECG) recordings and can therefore be easily obtained without imposing any constraints on the subject. Therefore, RSA can be used as a surrogate technique to determine respiratory frequency. In 2007, Denver et al. (5) demonstrated in humans that RSA frequency is the same as respiratory frequency in healthy subjects by comparing the RSA frequency to the respiratory frequency obtained from a pneumotachograph. In animals, Boychuk and Hayward (3) also established a correlation between RSA frequency and respiratory frequency monitored by whole body plethysmography. However, in the abovementioned studies, comparisons were based on simple regression analysis and RSA was measured at rest, in the absence of activity. This raises the question of the real correlation between RSA and respiratory frequency when 1) analysis is based on Passing-Bablok regression, and 2) the level of activity increases. To answer this question, we compared RSA to respiratory frequency obtained by either tracheal recordings in anesthetized animals or subpleural recordings (13) in conscious animals during low, medium, or high levels of activity measured by telemetric recordings.

## MATERIALS AND METHODS

**Animals.** Male Sprague-Dawley rats (Centre d'Elevage R. Janvier, Le Genest-Saint-Isle, France), weighing 250–300 g, were used ( $n = 15$ ). All animals were kept under controlled environmental conditions ( $22 \pm 1^\circ\text{C}$ ; 60% relative humidity; 12-h light/dark cycle; food and water ad libitum). Procedures involving animals and their care were all performed in conformity with institutional guidelines, in compliance with national and international laws and policies (Council Directive 87–848, October 19, 1987, Ministère de l'Agriculture et de la Forêt, Service Vétérinaire de la Santé et de la Protection Animale; Permission 75855 to C. Sévoz-Couche).

**Tracheal cannulation and ECG recordings in anaesthetized rats.** A group of rats ( $n = 9$ ) were anesthetized with pentobarbital sodium (60

Address for reprint requests and other correspondence: C. Sévoz-Couche, CR-ICM, UPMC/INSERM, UMR-S 975; CNRS UMR 7225, Faculté de Médecine UPMC, Site Pitie-Salpêtrière, Paris F-75013, France (e-mail: caroline.sevoz-couche@upmc.fr).

**AQ:4**

## Innovative Methodology

2

Respiratory Sinus Arrhythmia and Respiratory Frequency During Activity • Brouillard C et al.

mg/kg ip). The trachea was cannulated to monitor respiration (16). The cannula was connected to a pneumotachograph (Fleisch 0000), linked to a volume transducer (Digitimer Neurolog, NL 905). ECG was recorded using stainless steel pins placed subcutaneously into fore- and hindpaws. ECG signals were amplified and filtered (Universal Amplifier; Gould, Courtaboeuf, France). ECG and respiratory signals were relayed to a 1401 interface (1401 Plus; CED) connected to running Spike 2 Software (6.14; CED). Recordings lasted 1 h in each animal. Rectal temperature was maintained at 37°C with a thermostatically controlled heating blanket.

**Radiotelemetric probe implantation.** Another group of rats ( $n = 6$ ) was implanted with radiotelemetric probes (CXT P50; Data Sciences International, St. Paul, MN) for subpleural pressure and ECG recording, according to the technique previously used in monkeys (13). Briefly, rats were anesthetized with 2% inhaled isoflurane. The transmitter fluid-filled catheter was threaded through the serosal layer of the oesophagus and advanced cranially past the junction with the diaphragm and into the thoracic cavity. The ECG sensor leads were tunneled from the abdominal cavity. One lead (wire loop) was optimally fixed to the dorsal surface of the xyphoid process, while the other lead was subcutaneously tunneled on the thorax to the superior insertion of the sternohyoid muscle (17). During the recovery period (10 days), the animals were handled daily to habituate to the investigator. Dataquest A.R.T 4.1 software was used to record telemetry signals for 5 days, starting 10 days after probe insertion. Signals were transmitted for 4 min every 2 min during each data collection period (4 h/day, from 1:00 PM to 5:00 PM) and were exported to Spike 2 software (version 6.14; CED) for offline respiratory and HR variability (HRV) analyses.

**Data analysis.** Tracheal respiratory frequency (TRF) was determined as the mean of four 90-s time intervals. Pleural respiratory frequency (PRF) was determined as the mean of four 90-s time intervals

determined for each level of activity: low (activity <2 per 10 s), medium (activity between 2 and 5 per 10 s), and high (activity greater than 5 per 10 s). HRV analyses were performed on the same time intervals as those used for PRF or TRF measurement. Power spectra (0–2.0 Hz) were obtained by Fourier transformation (size 256, Hanning window, sample interval: 0.2 s). When tachypnoeic episodes were observed (usual maximal duration of ~5 s), corresponding power spectra (0–12.5 Hz) were obtained using a Fourier transformation of 0.04 Hz sample interval. Very LF, LF, and HF powers were situated in the ranges of 0–0.2, 0.2–0.7, and 0.7–2.0 Hz, respectively. HF power is exclusively under parasympathetic (vagal) control and includes the RSA peak (15), i.e., the change in heart period corresponding to the inspiratory and expiratory phases of the respiratory cycle.

**Statistical analysis.** Data are presented as means  $\pm$  SE. One-way ANOVA followed by Dunnett's pairwise comparison for respiratory rate during activity (activity between 2 and 5 or >5 per 10 s) vs. control (activity <2 per 10 s) was used. Similarly, comparison for respiratory rate during mixed pattern of respiration (regular breathing associated to tachypnoeic episode) vs. control (regular breathing only) was used. These analyses were done with SigmaPlot 12.0 (Systat Software).  $P = 0.05$  was defined as the limit of statistical significance. The interchangeability of RSA determined by TRF and PRF was checked using Passing-Bablok regression. In addition, the Bland-Altman plot was applied to determine intermethod bias and limits of agreement. These analyses were performed with XLSTATS software (v. 2014.2.07; Addinsoft).

## RESULTS

In anesthetized animals (Fig. 1A), mean TRF was  $93.1 \pm 3.7$  F1 cycles/min (range: 81 to 112 counts/min), corresponding to a respiratory frequency of  $1.551 \pm 0.063$  Hz (range: 1.35 to 1.9

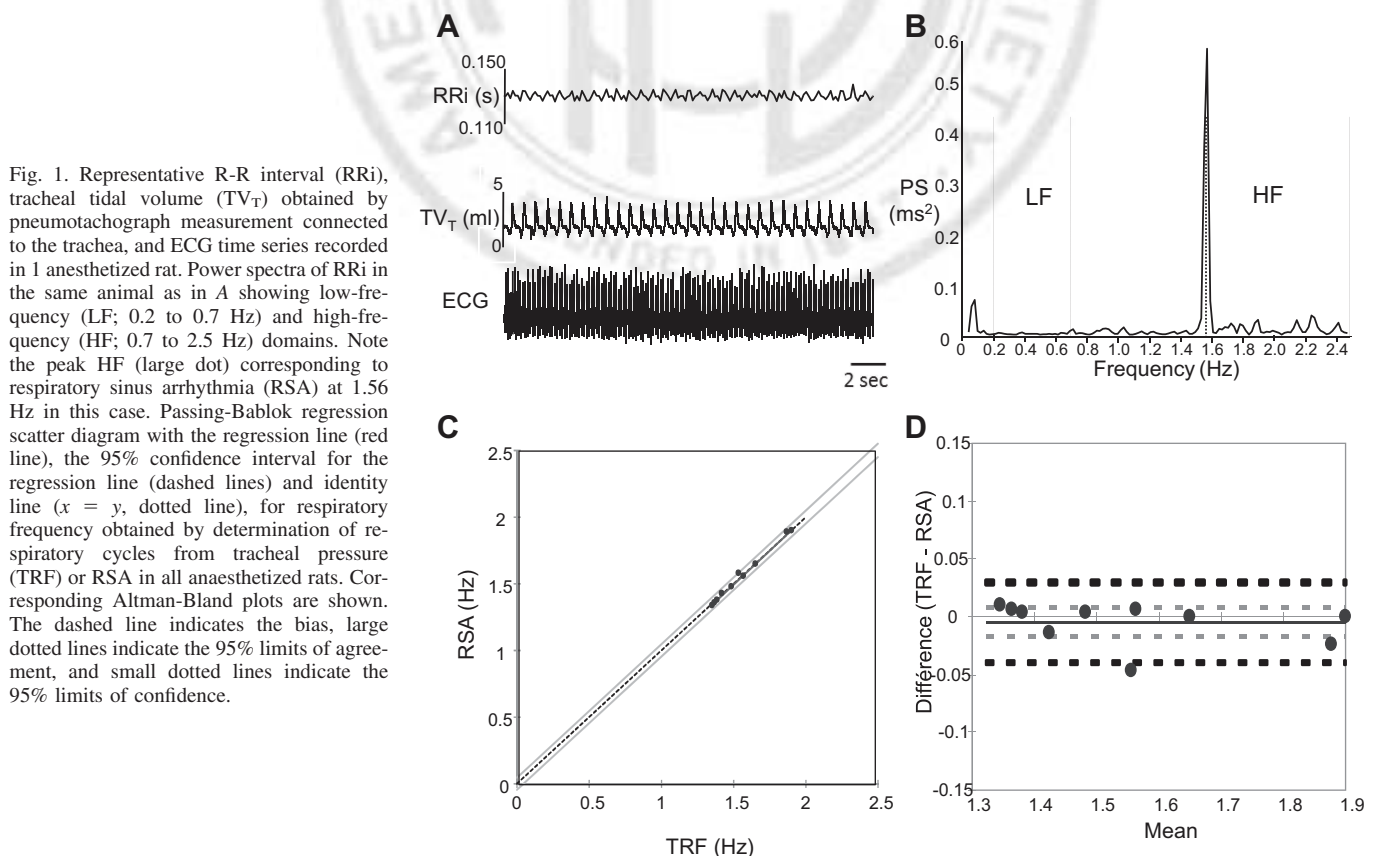


Table 1. *Passing–Bablok regression analysis comparing respiratory frequency measurement obtained by either tracheal (regression analysis 1) or subpleural (regression analyses 2 to 4) approaches and RSA determination*

Variable X Measurement	Variable Y: RSA Measurement/Value	95% CI
<i>Regression analysis 1</i>		
Tracheal measurement		
Intercept A	−0.36	From −0.29 to 0.027
Slope B	1.022	From 0.982 to 1.200
P value	0.819	
<i>Regression analysis 2</i>		
Subpleural measurement (activity <2)		
Intercept A	0.034	From −0.122 to 0.165
Slope B	0.980	From 0.900 to 1.080
P value	0.441	
<i>Regression analysis 3</i>		
Subpleural measurement (activity <2–5>)		
Intercept A	−0.193	From −0.755 to 0.273
Slope B	1.136	From 0.833 to 1.500
P value	0.900	
<i>Regression analysis 4</i>		
Subpleural measurement (activity >5)		
Intercept A	0.125	From −0.568 to 0.600
Slope B	0.927	From 0.600 to 1.394
P value	0.699	

CI, confidence interval; RSA, respiratory sinus arrhythmia.

Hz). Mean RSA peak frequency (Fig. 1B) was  $1.557 \pm 0.064$  Hz. Passing-Bablok regression analysis (Fig. 1C) showed that intercept A and slope B values were contained in their relative confidence intervals (CIs; Table 1, *regression analysis 1*), confirming signal interchangeability. An Altman-Bland plot of the same data set (Fig. 1D) showed a bias of 0.005 with limits of agreement of  $-0.018$  to  $0.007$ . In conscious animals, pleural PRF (Fig. 2) varied with the level of activity (Fig. 3). Mean PRF was  $1.59 \pm 0.03$  Hz for rat activity  $>5$  per 10 s (high),  $1.53 \pm 0.02$  Hz for rat activity between 2 and 5 per 10 s (medium) and  $1.49 \pm 0.02$  Hz for rat activity  $<2$  per 10 s (low). PRF at high activity was significantly higher than at low activity ( $P = 0.008$ ) but not compared with medium activity ( $P = 0.280$ ). Passing-Bablok regression with RSA frequency (Fig. 3, A.1–C.1) showed that intercept A and slope B values were contained in their relative CIs (Table 1, *regression analyses 2–4*), confirming signal interchangeability, regardless of the animal's level of activity. An Altman-Bland plot of the same data sets (Fig. 2, A.2–C.2) showed a bias of  $-0.001$  with limits of agreement of  $-0.007$  to  $0.007$  for low activity,  $-0.016$  with limits of agreement of  $-0.030$  to  $-0.002$  for medium activity, and  $-0.006$  with limits of agreement of  $-0.113$  to  $0.100$  for high activity. RSA was also looked for during sniffing-like tachypnoeic episodes, be them, or not, associated to increased activity. As these episodes were of very short duration ( $<10$  s), we analyzed pretachypnoeic (regular breathing only) or mixed (tachypnoea intermingled with regular breathing) periods (Fig. 4). Regular breathing frequency was equal to  $1.59 \pm 0.05$  Hz during very low activity (Fig. 4A.2) and  $1.88 \pm 0.04$  Hz (Fig. 4B.2), with corresponding RSA observed in power spectra (Fig. 4, A.3 and B.3). During tachypnoeic episodes, maximum respiratory rate was signifi-

cantly increased to  $6.5 \pm 1.2$  and  $7.5 \pm 1.0$  Hz ( $P < 0.001$ , respectively). No RSA peaks above 4 Hz was observed.

## DISCUSSION

This study shows that the ECG HF peak attributed to respiratory sinus arrhythmia can be used as a surrogate for respiratory frequency measurements across a range of direct activity states in rats. Interchangeability decreased slightly at high activity levels.

Pleural pressure can be measured to directly assess the mechanical properties of the lung. Pneumotachograph analyses of respiration are commonly used in humans (2), but this method induces constraint for the subject and may affect respiration itself. Pneumotachograph or pleural pressure methods can be useful in anesthetized animals and have been validated by the perfect fit of respiratory frequency obtained in a plethysmograph chamber (13). However, these methods appear to be excessively invasive when only this parameter needs to be recorded. In contrast, ECG recordings are easy to obtain and noninvasive and can be used to analyze HRV. RSA, observed in the HF domain of spectral analysis (15), is characterized by periodic increases and decreases in HR that occur at a frequency similar to that of respiration. Various authors have assumed that RSA and respiratory frequency are parallel outputs of a “common cardiopulmonary oscillator” (6). We first compared RSA to respiration frequency obtained with a pneumotachograph in anaesthetized animals by Passing-Bablok analyses (1). This method has the advantage of being independent of the hypothesis of error distribution (8), unlike the regression analysis that is currently used to compare RSA and respiratory frequency (5). The Passing-Bablok procedure is used on variables that have a linear relationship and that are highly correlated. It is a nonparametric approach and the requirements for Passing-Bablok regression are continuously distributed measurements (covering a broad concentration range) and linear relationship between two methods. We found no systematic or proportional difference between the two methods, as 95% CI for the intercept included zero and 95% CI for the slope included one. This was confirmed by Bland-Altman analyses (most points were included within the CI).

Respiratory frequency was also obtained by subpleural recordings in conscious rats using telemetric implants for ECG recording, which can be used to determine different levels of activity. Respiratory frequency was found to increase when activity and respiratory frequency increased. The CI for the

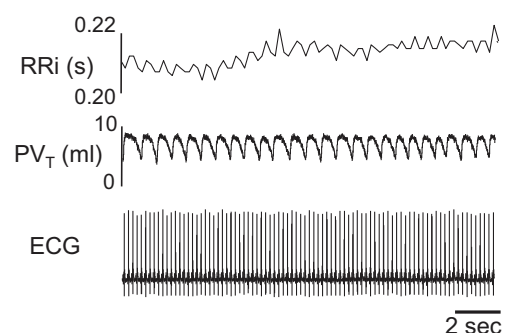


Fig. 2. Representative RRi, pleural tidal volume (PV<sub>T</sub>), and ECG time series recorded by telemetry in 1 conscious rat.



## Innovative Methodology

4

Respiratory Sinus Arrhythmia and Respiratory Frequency During Activity • Brouillard C et al.

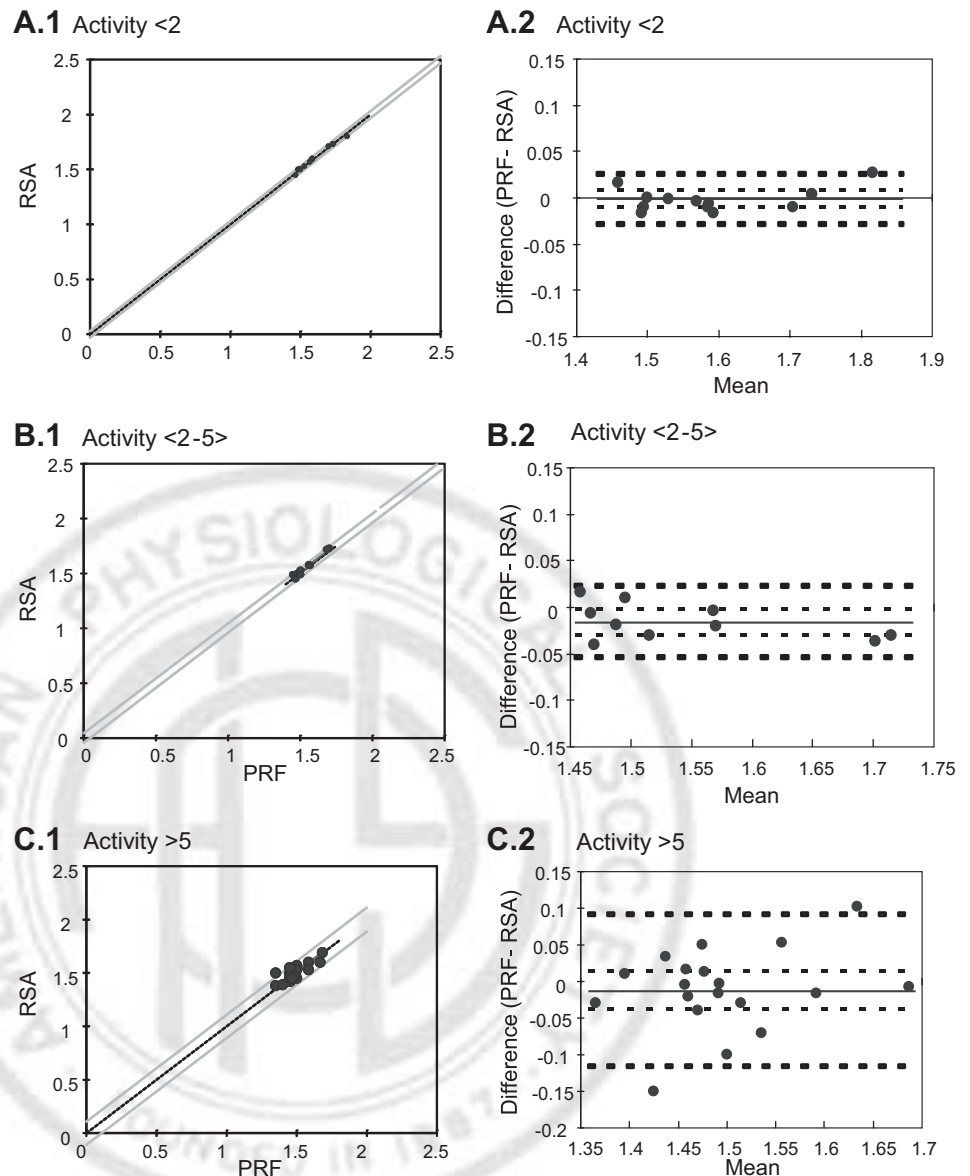
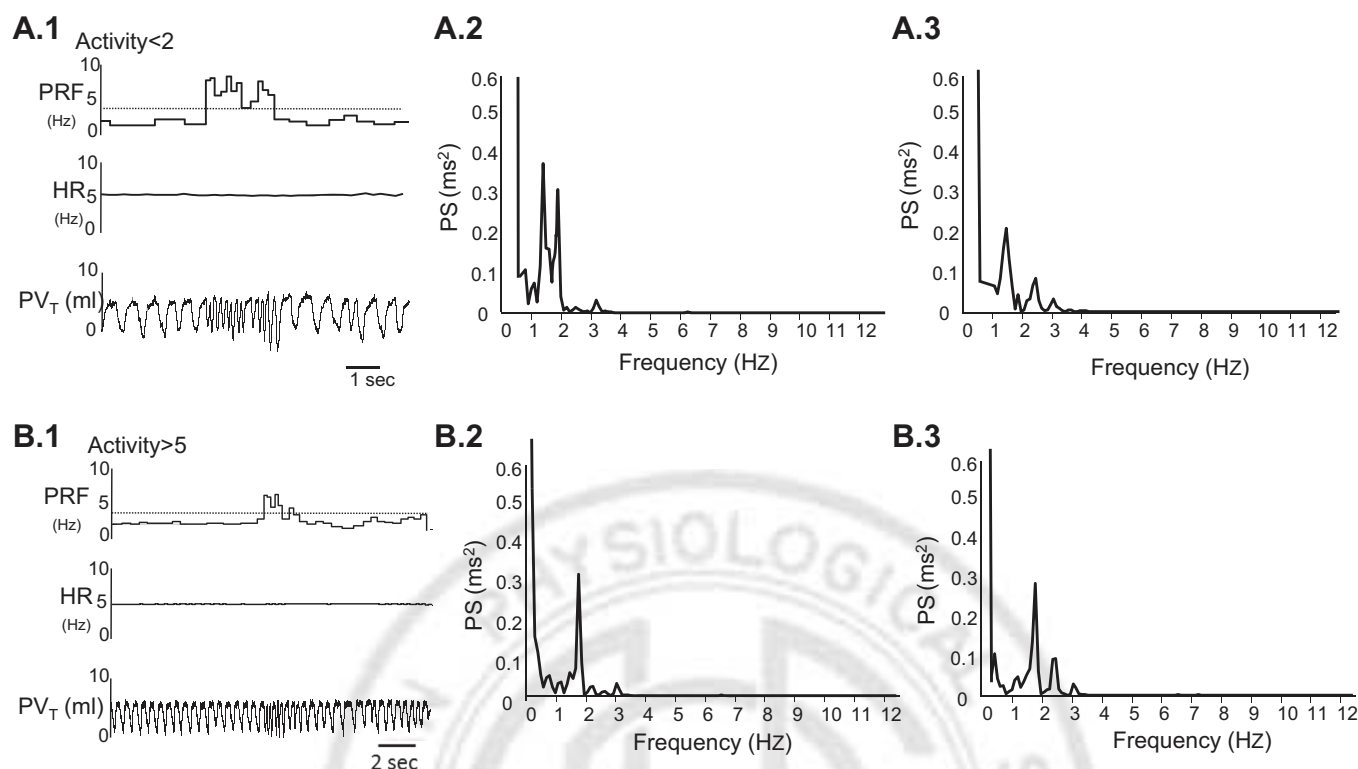


Fig. 3. Passing-Bablok regression scatter diagram (A.1–A.3) and corresponding Altman-Bland plots (A.2–C.2) for respiratory frequency obtained by determination of respiratory cycles from pleural pressure (PRF) or RSA in conscious rats for low (activity <2 per 10 s), medium (activity between 2 and 5 per 10 s), and high (activity >5 per 10 s) levels of activity.

intercept on Passing-Bablok graphs, although it increased with the level of activity, included zero. Similarly, the limits of agreement on the Bland-Altman plot were larger when activity increased but remained very close to and included zero. No significant difference was therefore observed between the two techniques to determine respiratory frequency, regardless of the level of activity.

Sniffing is an active behavior. There are two types of sniffing episodes: early studies showed that some (9–12 Hz) could be associated to a reward anticipation (4), but others are related to obvious exploratory behavior (6–9 Hz) (11, 14). Olfaction is one of the principal sources of sensory information in rats, and respiratory pattern during exploration (associated with an increased activity level) is a dramatic and rapid change in the respiratory rate associated with rapid protraction/retraction of the nose. Of note, due to the metabolic need to coordinate breathing and swallowing, small animals (rats and mice) often lick at frequencies similar to those of sniffing (4–8

Hz) (11). These tachypnoeic episodes occur without increased activity. We did observe tachypnoeic episodes, occurring during the usual slow and regular breathing; some of these episodes were associated with increased activity and others were not of note; breathing frequency during these episodes was under 9 Hz and therefore did not correspond to anticipatory reward. We analyzed RSA with power spectra that was superior to 9 Hz (i.e., 12.5 Hz) to ensure the visualization of fast respiratory frequency. We found that during increased activity or not, RSA was mostly the reflect of the usual regular breathing only (inferior to 2 Hz). Analyses of mixed periods showed that faster breathing between 2 and 3 Hz was present, but the respiratory rate (superior to 4 Hz) was not observed, confirming previous findings on exploratory sniffing (10). It appears that this frequency corresponds, or is very close, to HR. Moreover, sniffing consist of a series of fast and forced nasal inhalations with small passive exhalations (19). As RSA is the reflect of HR modifications between inspiration and



**EQ:1** Fig. 4. Representative PRF obtained by determination of respiration from pleural pressure. Heart rate (HR) and PV<sub>T</sub>, recorded by telemetry in 1 conscious rat, during low (<2 per 10 s; A.1) or high (>5 per 10 s; B.1) activity. Corresponding power spectra of regular (A.2 and B.2) or mixed (tachypnoeic episode intermingled with regular, A.3 and B.3) breathing. Note the highest RSA at 1.56 Hz in A and 1.98 Hz in B corresponding to regular breathing, and the absence of peaks superior to 3.5 Hz in both cases (dotted lines in PRF).

expiration, it seems probable that RSA would not reflect a fast and incomplete respiratory cycle. It was shown that vagal feedback from pulmonary stretch receptors is obligatory for the generation of a neurally mediated RSA (18). During sniffing and fast only inspirations, it is possible that there is no activation of lung stretch receptors, explaining that RSA could not occur during these specific periods. Myographic recordings may be useful to answer this question. It is worthwhile to note that these periods are of very short duration (<10 s), scarcely distributed, and predominantly observed at the beginning or the end of the recording.

In conclusion, RSA frequency appears as an adequate reflection of breathing frequency, in anesthetized as well as in conscious animals. These observations provide an easy to obtain, noninvasive, unrestraining method to determine respiratory frequency that stays accurate independently of the level of activity, even if rare and very short tachypnoeic episodes cannot be detected.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We thank Françoise Camus for help in animal care and Anthony Saul for help with English style and grammar.

#### GRANTS

This work was supported by the French Government "Investissement d'Avenir ANR-10-AIHU 06" Programme.

#### DISCLOSURES

**AQ:3** No conflicts of interest, financial or otherwise, are declared by the author(s).

#### AUTHOR CONTRIBUTIONS

Author contributions: C.B., P.C., and C.S.-C. performed experiments; C.B., T.S., and C.S.-C. analyzed data; C.B. and C.S.-C. prepared figures; C.B. and C.S.-C. drafted manuscript; C.B., P.C., T.S., and C.S.-C. approved final version of manuscript; P.C., T.S., and C.S.-C. edited and revised manuscript; T.S. and C.S.-C. interpreted results of experiments; C.S.-C. conception and design of research.

#### REFERENCES

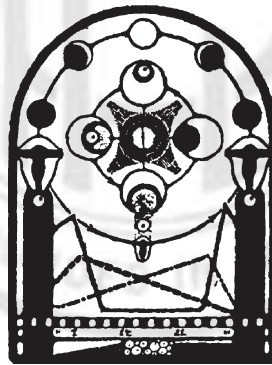
1. Bablok W, Passing H. Application of statistical procedures in analytical instrument testing. *J Autom Chem* 7: 74–79, 1985.
2. Baldwin MR, Checkley W, Wise RA, Khattry SK, LeClerq SC, West KP. A cleaning and calibration method for the SpiroPro portable spirometer's pneumotachometer tube in a remote field study. *Respir Care* 55: 443–452, 2010.
3. Boychuk CR, Hayward LF. Prenatal nicotine exposure alters postnatal cardiorespiratory integration in young male but not female rats. *Exp Neurol* 232: 212–221, 2011.
4. Clarke S, Trowill JA. Sniffing and motivated behavior in the rat. *Physiol Behav* 6: 49–52, 1971.
5. Denver JW, Reed SF, Porges SW. Methodological issues in the quantification of respiratory sinus arrhythmia. *Biol Psychol* 74: 286–294, 2007.
6. Eckberg DL. The human respiratory gate. *J Physiol* 548: 339–352, 2003.
7. Friedman BH. An autonomic flexibility-neurovisceral integration model of anxiety and cardiac vagal tone. *Biol Psychol* 74: 185–199, 2007.
8. Fuhrman C, Chouaïd C. [Concordance between two variables: numerical approaches (qualitative observations-the kappa coefficient-; quantitative measures)]. *Rev Mal Respir* 21: 123–125, 2004.
9. Hayano J, Yasuma F, Okada A, Mukai S, Fujinami T. Respiratory sinus arrhythmia a phenomenon improving pulmonary gas exchange and circulatory efficiency. *Circulation* 94: 842–847, 1996.

## Innovative Methodology

6

Respiratory Sinus Arrhythmia and Respiratory Frequency During Activity • Brouillard C et al.

10. **Hirsch JA, Bishop B.** Respiratory sinus arrhythmia in humans: how breathing pattern modulates heart rate. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 241: H620–H629, 1981.
11. **Kabir MM, Beig MI, Baumert M, Trombini M, Mastorci F, Sgoifo A, Walker FR, Day TA, Nalivaiko E.** Respiratory pattern in awake rats: effects of motor activity and of alerting stimuli. *Physiol Behav* 101: 22–31, 2010.
12. **Molkov YI, Abdala APL, Bacak BJ, Smith JC, Paton JF, Rybak IA.** Late-expiratory activity: emergence and interactions with the respiratory CpG. *J Neurophysiol* 104: 2713–2729, 2010.
13. **Murphy DJ, Renninger JP, Coatney RW.** A novel method for chronic measurement of respiratory function in the conscious monkey. *J Pharmacol Toxicol Methods* 46: 13–20, 2001.
14. **Nalivaiko E, Bondarenko E, Lidström A, Barry RJ.** Respiratory component of the orienting reflex: a novel sensitive index of sensory-induced arousal in rats. *Front Physiol* 2: 114, 2011.
15. **Porges SW, Heilman KJ, Bazhenova OV, Bal E, Doussard-Roosevelt JA, Koledin M.** Does motor activity during psychophysiological paradigms confound the quantification and interpretation of heart rate and heart rate variability measures in young children? *Dev Psychobiol* 49: 485–494, 2007.
16. **Sévoz C, Callera JC, Machado BH, Hamon M, Laguzzi R.** Role of serotonin<sub>3</sub> receptors in the nucleus tractus solitarius on the carotid chemoreflex. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 272: H1250–H1259, 1997.
17. **Sgoifo A, Stilli D, Medici D, Gallo P, Aimi B, Musso E.** Electrode positioning for reliable telemetry ECG recordings during social stress in unrestrained rats. *Physiol Behav* 60: 1397–1401, 1996.
18. **Taha BH, Simon PM, Dempsey JA, Skatrud JB, Iber C.** Respiratory sinus arrhythmia in humans: an obligatory role for vagal feedback from the lungs. *J Appl Physiol* 78: 638–645, 1995.
19. **Tomori Z, Benacka R, Donic V.** Mechanisms and clinicophysiological implications of the sniff- and gasp-like aspiration reflex. *Respir Physiol* 114: 83–98, 1998.



**Article n°4**

**Chronic stress-induced anxiety-like state can lead to a long-lasting reduction in breathing frequency.**

Brouillard C, Carrive P, Camus F, De Boer SF, Bénoliel JJ, Similowski T, and Sévoz-Couche C. (J. Physiol, soumis)

# **Repeated social defeat can lead to a long-lasting reduction in breathing frequency**

Charly Brouillard<sup>1, 2, 3</sup>, Pascal Carrive<sup>5</sup>, Françoise Camus<sup>1</sup>,  
Jean-Jacques Bénoliel<sup>1</sup>, Thomas Similowski<sup>2, 3, 4</sup>, and Caroline Sévoz-Couche<sup>1, 2, 3</sup>

1- CR-ICM, UPMC/INSERM, UMR-S 975; CNRS UMR 7225, Faculté de médecine UPMC, Site Pitie-Salpêtrière, Paris F-75013, France

2- Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, UMR\_S 1158, Neurophysiologie Respiratoire Expérimentale et Clinique, F-75005, Paris, France

3- INSERM, UMR\_S 1158, Neurophysiologie Respiratoire Expérimentale et Clinique, F-75005, Paris, France

4- APHP, Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière, Charles Foix, Service de Pneumologie et réanimation médicale (département R3J), 75013 Paris, France

5- Blood Pressure, Brain and Behavior Laboratory, School of Medical Sciences, University of New South Wales, Sydney, NSW, Australia

## **List of contribution:**

CB : study design, data acquisition, data analysis, drafting of manuscript, revising of manuscript in final form

PC : study design, data acquisition, data analysis, revising of manuscript

FC : analysis and interpretation of data

JJB: study design and interpretation of data

TS : data analysis, revising of manuscript

CSC: study design, data acquisition, data analysis, drafting of manuscript, revising of manuscript (main investigator)

**Running head:** Anxiety and long-lasting respiratory modulation

## **Corresponding author:**

Charly Brouillard,

E-mail address: cbrouillard@hotmail.fr



### **Key points (150 words max, 5 points)**

- We investigated the long-term changes in respiratory rate in rats exposed to repeated social defeat (4 sessions), a procedure that leads to an anxiety-like state.
- Respiratory rate, which was extracted from the respiratory sinus arrhythmia peak frequency of the ECG, was reduced in all the defeated animals up to 10 days after the first session of defeat and this was associated with an anxiety-like state.
- At 30 days, one half of the defeated rats had recovered, but the other half still displayed a reduced respiratory rate, although they showed no detectable sign of anxiety.
- Pharmacological blockade of the dorsomedial hypothalamus (DMH) and nucleus tractus solitarii (NTS) 5-HT<sub>3</sub> receptors prevented the stress-induced reduction in respiratory frequency at 10 and 30 days.
- In conclusion, repeated social stress can lead to a persisting bradypnea that outlasts the anxiety-like state and is due to a chronic activation of the DMH and NTS.

## Abstract

Previous work has shown that repeated social defeat induces long-lasting cardiovascular changes associated with anxiety. Here, we investigated whether social defeat also induces long-term changes in respiratory frequency. Respiratory frequency was extracted from the RSA (Respiratory sinus arrhythmia) peak frequency of the ECG. The subjects were male rats subjected to social defeat sessions on four consecutive days.

Respiratory frequency was recorded six days (D10) or 26 days (D30) after social defeat under anesthesia. At D10, defeated (D) rats were in an anxiety-like state, and all displayed bradypnea. Anxiolytic treatment with chlordiazepoxide abolished the anxiety-like symptoms as well as the bradypnea. At D30, when all signs of anxiety-like state had disappeared, half of the rats still displayed bradypnea ( $D_L$  rats), while the others had recovered ( $D_H$  rats). Acute blockade of the dorsomedial hypothalamus (DMH) or nucleus tractus solitarius (NTS) 5-HT<sub>3</sub> receptors reversed the bradypnea in all D rats at D10 and in  $D_L$  rats at D30.

Respiratory frequency was also followed up longitudinally using radiotelemetry. Retrospective analysis of  $D_L$  and  $D_H$  rats shows that  $D_H$  started to recover after D10 and that by D18 they were similar to ND rats while  $D_L$  rats remained bradypneic until D30.

In conclusion, social stress induces a robust chronic bradypnea mediated by DMH neurons and NTS 5-HT<sub>3</sub> receptors that is secondary to an anxiety-like state up until D10. Recovery occurs thereafter, however bradypnea may still persist in half of the population up to D30 despite an apparent recovery of the anxiety like state.

## Glossary

HF: High-Frequency domain

HRV: Heart Rate Variability

RSA: Respiratory Sinus Arrhythmia

DMH: Dorsomedial Hypothalamus

NTS: Nucleus of Tractus Solitarius

ND: Non-defeated rats

D: Defeated rats

D<sub>L</sub>: Defeated rats with low RSA peak frequency at D30

D<sub>H</sub>: Defeated rats with high RSA peak frequency at D30

## Introduction

There is an important reciprocal link between respiration and anxiety (Van Diest et al. 2006). Thus, respiratory distress and asphyxia are dreadful feelings. On the other hand, fear and anxiety can have profound effects on respiration. Clinical studies have shown for example that panic disorder, which is characterized by acute and unexpected anxiety attacks and substantial anxiety over the possibility of experiencing further attacks, is associated with symptoms that include palpitations, shortness of breath, sweating and hyperventilation (Abelson et al. 2010). On the other hand, there is a decrease in respiratory rate during some specific responses to stress, for instance during freezing behaviour in the rat when it is associated with ultrasonic vocalizations (Hegoburu et al. 2011). Comparatively less is known about the long term effects of emotional stress on breathing. In the adult rat, a strong neonatal emotional stress such as maternal separation, can lead to a decrease in breathing rate during non REM sleep (Kinkead et al. 2009). A lower breathing rate was also noted under anesthesia in Flinder-Sensitive rats, a well-validated animal model of depression (Padley et al. 2005). However, in patients with mood depression disorders, breathing rate does not seem to be altered, although cardiovascular changes do occur (Berger et al. 2012). Clearly, more work needs to be done to understand the long-term effects of emotional stress on breathing.

This study has two aims. The first aim is to characterize the long-term effects of an emotional stress on breathing. The second aim is to explore the central mechanisms underlying these changes and more specifically, the role of the dorsomedial hypothalamus (DMH) and of the 5-HT<sub>3</sub> receptor in the nucleus of the tractus solitarii (NTS). It is well established that the DMH plays a critical role in mediating the cardiovascular and neuroendocrine response to psychological stress (Fontes et al. 2011; Sévoz-Couche et al. 2013). This may include respiration as well, as suggested by a recent work showing that the DMH mediates tachypnea associated with acute stress responses (Bondarenko et al. 2015). Activation of NTS 5-HT<sub>3</sub> receptors is also known to contribute to the expression of the autonomic and cardiovascular changes evoked by chronic stress or acute stimulation of DMH (Sévoz-Couche et al. 2003; Sévoz-Couche et al. 2013). These receptors also contribute to respiration, however their activation has an inhibitory effect on breathing (Veasey 2003).

Our measure of breathing was the respiratory rate, which we extracted from ECG recordings of respiratory sinus arrhythmia (RSA). RSA is a naturally occurring rhythm in the

beat-to-beat heart rate pattern, that occurs at the same frequency as respiration. It can be measured by spectral analysis of heart rate variability (HRV) as the highest peak in the high-frequency band (HF) (Denver et al, 2007 ; Thayer et al. 2012). The analysis of RSA peak frequency is an efficient and user-friendly method to measure respiratory rate, in anaesthetized as well as in conscious freely-moving animals (Brouillard et al. 2014).

In the first part of this study, we determined the long term effect on respiratory rate 10 and 30 days after social defeat, a chronic emotional stress that induces an anxiety-like state (Rivat et al. 2010; Blugeot et al. 2011; Sévoz-Couche et al. 2013). We also tested the involvement of the DMH and 5-HT<sub>3</sub> NTS receptors in this effect. The second part was a longitudinal study using implanted telemetric probes in which we evaluated retrospectively the changes in breathing in the 30 days that followed social defeat.

## **Methods**

### **Animals**

Experiments were carried out in Sprague Dawley male rats (n=212, Centre d'Elevage R. Janvier, Le Genest-St.- Isle, France), weighing 290-310 g. They were housed in individual cages (length, 45 cm; width, 25 cm; height, 17 cm) for one week before the beginning of the experiments. Wild Type Groningen male rats (*Rattus norvegicus*, WTG strain), originally bred at the University of Groningen (The Netherlands) under conventionally clean conditions (Sgoifo et al. 1998), weighing 400–500 g, served as resident rats, in confrontation encounters. The same WTG rats were used for all the successive series of experiments. All animals were kept under controlled environmental conditions (22 ± 1°C; 60% relative humidity; 12 h light/dark cycle; food and water *ad libitum*). Procedures involving animals and their care were all performed in conformity with the institutional guidelines, which are in compliance with national and international laws and policies (Council directive 87-848, October 19, 1987, Ministère de l'Agriculture et de la Forêt, Service Veterinaire de la Sante et de la Protection Animale; permissions 75855 to C. Sévoz-Couche and 6180 to J.-J. Benoliel).

### **Experimental overview**

The study was organised into two parts (Fig.1). Study 1 (n=168) was a cross sectional study that ended either 10 days (group A, D10, n=95) or 30 days after the first session of social defeat

(group B, D30, n=73). The animals were anesthetised on their last day to record their ECG, which was then used to extract respiratory rate. On the day before (D9 and D29) they were tested in the elevated plus maze. Group A was further divided into two cohorts. Animals in Cohort A1 (n=68) did not receive any treatment after social defeat while those of Cohort A2 (n=27) received continuous infusion of an anxiolytic or saline from the time of the last session of social defeat until D10. Animals in Cohort A1 and Group B also received microinjections in the DMH or NTS while under anesthesia (on their last day) in order to test the role of DMH neurons and NTS 5HT<sub>3</sub> receptors. Study 2 (n=44) was a longitudinal study that ended 30 days after the first session of social defeat (D30). These animals were implanted with telemetric probes for daily recording of their ECG, which was then used to extract respiratory rate and reconstruct its time course over the 30 days period. ECG and respiratory rate were also recorded on the last day under anesthesia, as in animals of Study 1.

## **General procedures**

***Social defeat paradigm.*** Social defeat consisted of four daily conditioning sessions (Fig.1) that involved the same pairs of residents and intruders (Becker et al. 2001). Briefly, intruders were placed singly in a protective cage inside the resident home cage, allowing unrestricted visual, auditory, and olfactory contacts with the resident but precluded close physical contact. Then, the protective cage was removed with the resident present, allowing physical confrontation (three to four confrontations of 10 s each, during which the intruding animal was always dominated by the resident rat) with the intruder (defeated intruders); for non-defeated intruders (controls), the intruder had access to the entire resident home cage without resident. This chronic stress model is known to induce an anxiety-like state for at least five days after (D10) (Rivat et al. 2010; Blugeot et al. 2011; Sévoz-Couche et al. 2013).

***ECG recordings under anesthesia and RSA analysis.*** ECG recording was performed 10 days (Study 1/Group A) and 30 days (Study 1/Group B and Study 2) after the first session of social defeat (Fig1). The rats were anaesthetized with pentobarbital sodium (Ceva Santé Animale, Libourne, France; 60 mg kg<sup>-1</sup>, I.P.(Sévoz-Couche et al. 1998)) and placed in a stereotaxic frame, with the head fixed in the flat skull position. ECG was recorded using stainless steel pins placed subcutaneously into fore- and hind-paws. These signals were amplified and filtered (Universal Amplifier; Gould, Courtaboeuf, France). ECG signal was then relayed to a 1401 interface (1401

Plus; CED, Cambridge, UK) connected to a computer running Spike 2 (version 6.08) software (CED). Waveform data were imported offline into Spike CED (version 6.0). The RR interval signal was derived from the ECG. Power spectra were derived using fast Fourier transformation (size 256, Hanning window (Padley et al. 2005)), giving a final frequency resolution of 0.04 Hz. They were performed on the time interval between two consecutive beats (RR interval) derived from the ECG. Low and high frequency (LF and HF, respectively) powers were calculated within the frequency ranges 0.2– 0.7 Hz and 0.7-2.5 Hz, respectively. RSA peak frequency is the highest peak in the HF band (Sévoz-Couche et al. 2013).

The criteria for choosing segments for RSA analysis were stability of the signal and lack of ectopic beats. RSA was measured from 90-s segments 20 min before and 5 min after pharmacological blockade of the DMH or NTS 5HT<sub>3</sub> receptors (Study 1).

**Adrenal gland weight.** At the end of the physiological recording, the animals were killed and their adrenal glands were removed and weighted. Data were expressed relative to body weights (in mg/100 g body weight).

## Specific procedures

### Study 1

**Body weight.** Body weights in defeated and non-defeated rats were recorded daily at 9:00 A.M., from 7 days before social defeat to the end of the protocol (Group A: D10 and Group B: D30).

**Elevated plus-maze test (EPM).** At D9 or D29, the elevated plus-maze test was used to evaluate anxiety-related behaviour in animals. This test has been described in detail elsewhere (Rivat et al. 2010). The time spent in the various arms, and the numbers of entries into the open and closed arms of the plus-maze were recorded with custom-made software. The total number (open+closed) of arm entries was taken as an indicator of general activity. A lower time spent in open arms is considered to be an indicator of an anxiety-like state.

**Pharmacological blockade of the DMH (Group A Cohort A1 and Group B).** Microinjections of either saline or muscimol (Sigma Chemicals, St Louis, USA; 500 pmol in 0.1 µl of saline) into the DMH were performed at the following coordinates: P 3.0, L 0.5 and V 8mm from bregma (Netzer et al. 2011). Injections were made bilaterally to maximize the effect and because DMH control of HR has been shown to be asymmetric (Xavier et al. 2013).

***Pharmacological blockade of NTS 5-HT<sub>3</sub> receptors (Group A Cohort A1 and Group B).*** In other animals, microinjections of either saline or a selective 5-HT<sub>3</sub> receptor antagonist, granisetron (SmithKline-Beecham, Harlow, UK, 250 pmol in 0.1 µl) were performed in the NTS at the level of the calamus scriptorius (Sévoz-Couche et al. 2003) (L 0.5 and V 0.5 mm). Injections were also made bilaterally to maximize the effect.

***Histology (Cohort A1).*** DMH and NTS microinjection sites were identified from the tip of the micropipette track in 70 µm thick sections of brain tissue previously fixed in 10% formalin solution and cryoprotected in 20% sucrose solution for 5 days. Only rats with the injection sites correctly positioned in the DMH or NTS were considered for data analysis.

***Anxiolytic treatment (Cohort A2).*** ALZET osmotic pumps supplying vehicle (saline) or chlordiazepoxide (10 mg kg<sup>-1</sup> day<sup>-1</sup>, F. Hoffmann-La Roche, Basel, Switzerland) (Rivat et al. 2010) were implanted in rats on the morning of the day after completion of the social defeat (D5). The pumps (ALZET 2ML1) were implanted subcutaneously on the back under light isoflurane anesthesia as previously described (Sévoz-Couche et al. 2013). The infusion of VEH or CDZ was continuous from D5 to D10, to prevent the development of the anxiety-like state (Rivat et al. 2010).

## **Study 2**

***Radiotelemetric probe implantation.*** Two weeks before social defeat (D-15), rats were implanted with radiotelemetric probes (Data Sciences International, St. Paul, MN, USA) to enable recording of ECG and locomotor activity (Fig 1). The surgery was done in aseptic conditions and under anesthesia (Isoflurane). The rats were also pretreated with an analgesic (Xylocaïne, 5 mg/kg, s.c.), with an anti-inflammatory (metacam, 1 mg/kg, s.c.) and received antibiotics (Benicillin, 0.3 ml, i.p.) at the end of the surgery. The probes were implanted in the peritoneal cavity and wires were tunnelled subcutaneously up the side of the rib cage. The positive lead was attached to the dorsal side of the xiphoid process and the negative lead was passed down between the right sternomastoid and sternohyoid muscles down beside the trachea towards the manubrium and the thoracic inlet (Sgoifo et al. 1996).

***ECG recordings in conscious rats.*** Telemetric data were acquired every afternoon (1 to 6 pm) from D-3 to D30, using Dataquest A.R.T. 3.1 Gold software (Data Sciences). ECG waveform data were imported offline into Spike CED (version 6.0) where they were analysed to extract



RSA peak frequency as described above for Study 1. The RSA peak was determined from 2-min segments of ECG data and averaged across four segments. These segments were chosen on the basis of the quality and stability of the signal when the animal was at rest and immobile. ECG was also recorded on the last day (D30), under pentobarbital sodium anesthesia as mentioned above.

### **Statistical analysis**

Differences in the behavioural and physiological parameters between defeated and non-defeated groups were analysed with an unpaired student's *t* test. Comparisons of pharmacological treatments (pumps or microinjections) between defeated and non-defeated groups was done with a two-way ANOVA. Changes in body weight and RSA peak frequency between defeated and non-defeated groups across time were analysed with a two way repeated measure ANOVA. Post-hoc Bonferroni correction was applied after ANOVA when necessary, and results were considered significant if  $P < 0.05$ . Analyses were done with Prism 5.04 (Graph Pad Software)

## **Results**

### **Study 1/Group A/Cohort A1. Behavioral and respiratory changes evoked by social defeat at D10 and contribution of DMH neurons and NTS 5HT<sub>3</sub> receptors.**

Cohort A1 had a total of 68 animals, which were either defeated intruders (D,  $n=36$ ) or non-defeated intruders controls (ND,  $n=32$ ). The experiment stopped at D10, 6 days after the last session of social defeat (Fig 1).

*Body weight.* Changes in body weight before, during and after social defeat are shown on Fig 2A. There was no difference in body weight between ND and D rats in the days that preceded social defeat ( $416 \pm 3$  and  $415 \pm 3$  g, respectively, at D-1). However, D rats stopped putting on weight right from the first session of social defeat, while ND rats continued their normal growth. By the end of social defeat, D rats were lighter than ND rats, ( $423 \pm 4$  vs  $447 \pm 4$  g, respectively at D5). Weight gain in D rats remained slow in the following days, further widening the gap with the ND rats until the last day ( $430 \pm 6$ g vs  $470 \pm 7$ g, respectively, at D10). A repeated measure ANOVA from D1 to D10 confirmed a statistically significant difference between the two groups ( $p=0.001$ , Fig 2A) and Bonferonni post-hoc analysis showed that the difference was significant from D4 onwards ( $p < 0.05$ ).

*Elevated plus-maze test.* This behavioural test was done at D9 to assess the level of anxiety in the animals. The percentage of time spent in the open arm was significantly lower (34 %) in D rats compared to ND rats ( $137 \pm 5$  vs  $208 \pm 6$  s, respectively,  $p < 0.001$ , Fig 2B). There was no difference in the total number of arm entries between the two groups ( $29 \pm 2$  vs  $25 \pm 3$ , respectively,  $p = 0.7$ ), which indicates that the reduced time spent in the open arms was due to a higher level of anxiety rather than a reduced level of general activity.

*Adrenal gland weight.* Compared to ND rats, D rats had significantly heavier adrenal glands at D10 ( $13.6 \pm 0.4$  vs  $10.3 \pm 0.3$  mg/100g, respectively,  $p < 0.001$ , Fig 2C), indicating an increase in activity in the stress axis. Thus, as previously reported (Caroline Sévoz-Couche et al. 2013) (Rivat et al. 2010), all the D rats were in an anxiety-like state at D10.

*RSA peak frequency analysis.* Power spectral analysis performed on the RR interval signal extracted from the ECG at D10 revealed that D rats had a lower RSA peak frequency than ND rats ( $1.28 \pm 0.02$  vs  $1.65 \pm 0.02$  Hz, respectively,  $p < 0.001$ , Fig 2D&E). This corresponds to a respiratory rate of  $76.51 \pm 2.10$  and  $99.88 \pm 2.19$  cpm, respectively. Remarkably, RSA peak frequency values in D rats were all higher than in ND rats with no overlap between the two groups (Fig 2E). Thus social defeat had induced a very robust bradypnea in these animals.

*Effect of DMH inhibition and NTS 5-HT<sub>3</sub> receptors blockade on RSA peak frequency.*

Previous work from our lab has shown that DMH inhibition and NTS 5-HT<sub>3</sub> receptors blockade markedly reduces the long term cardiovascular effect evoked by social defeat when it is recorded at D10 (Sévoz-Couche et al. 2013). We sought to find out if this was also the case for the bradypnea. As shown on Fig 3A, the reduction in RSA peak frequency observed in D compared to ND rats was still observed after saline but not after bilateral muscimol microinjections into the DMH. This was confirmed by a statistically significant interaction between the defeat and treatment effects ( $p < 0.001$ , Supplemental Table 2). In the same manner, the reduction in RSA peak frequency in D rats was still observed after saline but not after bilateral injections of granisetron into the NTS (Fig 3B). This was also confirmed by a significant interaction between defeat and treatment effects. ( $p < 0.043$ , Supplemental Table 2).

Therefore, DMH neurons and 5-HT<sub>3</sub> NTS receptors contribute not only to the cardiovascular changes but also to the bradypnea associated with the anxiety-like state induced by social defeat. Next we asked whether the bradypnea was a result of the anxiety-like state and if it could be prevented by an anxiolytic treatment.

### **Study 1/Group A/Cohort A2- Behavioral and respiratory changes evoked by social defeat at D10, after anxiolytic treatment.**

ND and D rats (n=14 and 13, respectively) of Cohort A2 were treated with continuous infusion of an anxiolytic (chlordiazepoxide) from D4 to D10. The behavioral tests and physiological recordings were the same as in Cohort A1 (Fig 1).

*Elevated plus-maze test.* Saline treated D rats still spent less time in open arms than ND rats, as in Cohort A1. However, this difference disappeared after the chlordiazepoxide treatment (Fig 4A). The effect was confirmed by a significant interaction between defeat and treatment effects ( $p=0.008$ , Supplemental Table 3). In other words, the anxiolytic treatment was effective.

*Adrenal gland weight.* As with the elevated plus maze test, chlordiazepoxide treatment prevented the increase in adrenal gland weight evoked in D rats by the social defeat (Fig 4B). This was confirmed by a significant interaction between defeat and treatment effects ( $p=0.029$ , Supplemental Table 3).

*RSA peak frequency analysis.* As in cohort A1, a reduction in RSA peak frequency was observed in saline treated D rats. The chlordiazepoxide treatment practically abolished this effect (Fig 4C). This was also confirmed by a significant interaction between defeat and treatment effects ( $p=0.044$ , Supplemental Table 3).

These results confirm those of Cohort A1 and demonstrate that the bradypnea observed in D rats at D10 is due to the state of chronic anxiety that was induced by the social defeat. The next question was whether this bradypnea would still be present at a later time, eg at D30, 20 days later, when anxiety levels are known to have returned to normal (Blugeot et al. 2011).

### **Study 1/Group B. Behavioral and respiratory changes evoked by social defeat at D30 and contribution of DMH neurons and NTS 5HT3 receptors.**

Group B had a total of 73 rats (51 D and 22 ND rats), which were kept until D30, 25 days after the last session of social defeat (Fig 1).

*Body weight.* The changes in body weight from D-6 to D10 were practically the same as in Cohort A1 (Fig 5A). D rats did not put on weight during the four days of social defeat, and were slow to recover in the following days compared to ND rats (D5:  $403\pm 3$  vs  $433\pm 5$ g, D10:  $424\pm 3$  vs  $453\pm 5$ g, respectively). However D rats gradually increased their weight gain thereafter, slowly

closing the gap with the ND rats. A repeated measure ANOVA from D1 to D30 confirmed a main group effect ( $p=0.019$ , Fig 5A1). Posthoc analysis showed that the difference between D and ND rats was statistically significant from D5 to D12 but not thereafter.

*Elevated plus-maze test.* The time D rats spent in the open arms was the same as for ND rats ( $183\pm6$  vs  $194\pm10$  s, respectively,  $p=0.4$ , Fig. 5B). Thus no sign of an anxiety-like state could be detected in D rats at D29, unlike in Cohort A1 when they were tested at D9.

*Adrenal gland weight.* Similarly, at D30, adrenal gland weight in D rats was the same as in ND rats ( $10.7\pm0.3$  vs  $10.0\pm0.4$  mg/100g,  $p=0.3$ , Fig 5C).

*RSA peak frequency analysis.* In contrast, RSA peak frequency at D30 was still lower in D rats than in ND rats ( $1.44\pm0.04$  vs  $1.58\pm0.02$  Hz, respectively,  $p=0.008$ , Fig 6A), although the difference was not as marked as at D10 (less than half). A closer look at individual data of the D group suggests that it is made up of two subgroups, one with a RSA peak frequency similar to the ND group and another with a lower frequency (Fig 6A). Consequently, using the lowest RSA peak frequency of the ND group as the dividing line (1.40 Hz) we arbitrarily divided the D group into two subgroups,  $D_H$  above and  $D_L$  below ( $1.59\pm0.02$  Hz,  $n=28$  and  $1.28\pm0.02$  Hz,  $n=23$ , respectively). There was still a main group effect when comparing ND,  $D_H$  and  $D_L$  ( $p<0.001$ , Supplemental Table 1), with a significant difference between ND and  $D_L$  but not between ND and  $D_H$  ( $p=0.9$  and  $p<0.001$ , respectively, Bonferonni post hoc analysis, Fig 6A). A similar analysis was then performed retrospectively for the other parameters using these three groups (ND,  $D_H$  and  $D_L$ ). No main effect could be detected for Time spent in open arms in the EPM or adrenal gland weight (Fig 5B and Fig 5C, respectively  $p=0.15$  and  $p=0.26$ , Supplemental Table 1), showing that there was no difference in anxiety-like state between ND rats and the two subgroups of D rats. In terms of body weight change, no difference could be detected either between  $D_H$  and  $D_L$  over the period D1 to D30 ( $p=0.88$ , Fig 5A2).

Thus, although the anxiety levels of D rats had recovered by D30, half of the rats ( $D_L$ ) still showed the same bradypnea as at D10. Next we tested the role of the DMH and 5HT<sub>3</sub> NTS receptors in this D30 bradypnea as we had done for the D10 bradypnea in Cohort A1 animals.

*Effect of DMH inhibition and NTS 5-HT<sub>3</sub> receptors blockade.* As shown in Fig 6B, the D30 bradypnea was still observed in  $D_L$  rats after bilateral saline microinjections in the DMH, but not after bilateral muscimol microinjections. In fact the RSA peak frequency in muscimol injected  $D_L$  animals was the same as in ND and  $D_H$  rats injected with muscimol or saline. Statistical analysis

confirmed a significant interaction between defeat and muscimol ( $p=0.02$ , Supplemental Table 2) with pair-wise post-hoc comparisons showing a significant difference between muscimol and saline injected  $D_L$  rats ( $p=0.003$ ) but not between muscimol and saline injected ND and  $D_H$  rats ( $p=0.585$  and  $p=0.857$ , respectively). In the same manner, the D30 bradypnea was still observed in  $D_L$  rats after bilateral saline microinjections in the NTS, but not after bilateral granisetron microinjections. There was a significant interaction between defeat and granisetron ( $p=0.006$ , Supplemental Table 2) with significant pair-wise post-hoc comparisons between granisetron and saline injected  $D_L$  rats ( $p<0.001$ ) but not ND and  $D_H$  rats ( $p=0.63$  and  $p=0.89$ , respectively).

Therefore DMH neurons and 5HT3 NTS receptors contribute to the D30 bradypnea of  $D_L$  rats as they did at D10, suggesting that it is the same mechanism operating at the two time points. In other words, social defeat in these  $D_L$  produced a long lasting effect on respiration that outlasted the anxiety-like state. Next we try to find out when the  $D_H$  rats recovered and if there was any difference between  $D_L$  and  $D_H$  rats at an earlier stage.

**Study 2. Respiratory changes evoked by social defeat at D30 and time course of the respiratory changes.** This experiment was a longitudinal study conducted on 44 rats implanted with radiotelemetric probes and kept until D30. At D30, all 44 animals were anesthetised and their RSA peak frequency extracted from the ECG as in Study 1/Group B. As can be seen on Fig 7A, the distribution in RSA peak frequency in the D group at D30 was wide and very similar to that of the Study 1/Group B. Consequently, the D group was divided into  $D_H$  and  $D_L$  subgroups according to a dividing line which was the lowest RSA peak frequency of the ND group (1.34 Hz). Comparison of these three groups (ND,  $1.47\pm0.04$  Hz;  $D_L$ ,  $1.19\pm0.03$  Hz;  $D_H$ ,  $1.53 \pm 0.03$  Hz) revealed a significant group effect ( $p<0.001$ , Supplemental Table 1), with a significantly lower RSA peak frequency in  $D_L$  compared to ND ( $p<0.001$ ) and  $D_H$  ( $p<0.001$ ). ND and  $D_H$  were similar ( $p=0.84$ ). Adrenal glands were also weighted at D30. As in Study 1/Group B we found no difference between ND,  $D_H$  and  $D_L$  ( $8.96\pm0.45$ ,  $9.67\pm0.37$  and  $8.2\pm0.3$  mg/100g, respectively,  $p=0.10$ ; Supplemental Table 1).

We then looked retrospectively at the changes in RSA peak frequency extracted from the daily telemetric recording of ECG in the ND,  $D_L$  and  $D_H$  rats over the preceding 30 days (Fig 7B). The three groups of rats had the same average RSA peak frequency before social defeat on D-3 ( $1.56 \pm 0.05$ ,  $1.59 \pm 0.03$  and  $1.54 \pm 0.04$  Hz, respectively). A marked drop in RSA peak

frequency was then observed in the defeated  $D_L$  and  $D_H$  animals, which lasted until D10 as in Study 1/Cohort A1. Thereafter,  $D_H$  rats gradually recovered. Within one week, by D17, they had fully recovered and were the same as ND rats. In contrast,  $D_L$  did not recover and remained at a low RSA peak frequency until the last day. A repeated measure ANOVA over the entire 30 days confirmed a significant defeat effect ( $p < 0.001$ ) and a significant interaction between defeat and time ( $p < 0.001$ , Fig 7B). Bonferroni posthoc analysis revealed that  $D_H$  and  $D_L$  rats were significantly lower than ND rats as early as D2 ( $1.35 \pm 0.03$ ,  $1.33 \pm 0.04$  and  $1.58 \pm 0.06$  Hz, respectively) and that it was at D17 that  $D_H$  ( $1.48 \pm 0.04$ ) became significantly higher than  $D_L$  ( $1.33 \pm 0.03$ ) and equivalent to ND ( $1.51 \pm 0.04$  Hz). These differences persisted and were still present at D30 where they were equivalent to those recorded under anesthesia (Fig 7A and 7B).

## Discussion

Our model of social defeat induced a long lasting bradypnea that could be detected as a reduction in RSA peak frequency up to D30. At D10, it was observed in all the defeated animals and was associated with an elevated level of anxiety. No anxiety could be detected 20 days later at D30, however the bradypnea was still present in approximately half of the defeated animals. Importantly, this long lasting respiratory change was due to an increased activity of the DMH and NTS 5-HT<sub>3</sub> receptors.

### *Induction of a stress state by social defeat*

Previous work from our laboratory has shown that 4 consecutive days of social defeat induces an anxiety-like state that can be detected 5 days after the last session of defeat (D10) (Rivat et al. 2010; Blugeot et al. 2011; Sévoz-Couche et al. 2013). This anxiety-like state persists at least until D15 (Rivat et al. 2010) but has disappeared at D30 (Blugeot et al. 2011). The results of Study 1 replicate the findings of our previous studies. First, all the defeated rats lost weight during the social defeat, indicating that it was a major stress. Second, defeated rats spent less time in the open arm of the EPM at D10, but not at D30, indicating an anxiety-like state at D10 but not at D30. Similarly, the adrenal glands of defeated rats were heavier in defeated rats at D10 but not at D30, when compared to non-defeated rats. We also confirmed that these changes in open arm entry and adrenal weight at D10 were due to an anxiety-like state because they were abolished by chronic treatment with an anxiolytic from D5 to D10.



### ***Respiratory alterations induced by social defeat***

Respiratory frequency was extracted from the RSA peak frequency of the ECG, which is a reliable method that can be used in both the anaesthetised and conscious animal as we have shown recently (Brouillard et al. 2014). The social defeat had a profound effect on breathing frequency. Basically, all the defeated animals were bradypneic at D10. This bradypnea was observed under anesthesia (Study 1) as well as in the conscious state when animals were at rest (Study 2 with telemetry). More importantly, the bradypnea was linked to the anxiety-like state because it was prevented by anxiolytic treatment from D5 to D10.

However, the bradypnea was still observed in half of the defeated animals at D30 ( $D_L$ ) even though the anxiety-like state was gone at that stage. Indeed, there was no apparent sign of anxiety or stress in these bradypneic animals, as measured by time spent in the open arms of the EPM or adrenal gland weight. In this respect they were no different to the other half of defeated rats whose breathing frequency had returned to normal ( $D_H$ ), or to the non defeated animals.

Retrospective examination of the changes in breathing frequency in the longitudinal study of Study 2 (telemetry) revealed that  $D_H$  animals had started recovering after D10 and completed their recovery as a group one week later at D17. Interestingly, our previous work has shown that the anxiety-like state is still present at D15 in defeated animals (Rivat et al. 2010). It is therefore likely that bradypnea recovered in parallel to the anxiety state in  $D_H$  rats, as one would have expected. Why, then, did the breathing rate of  $D_L$  rats not recover? What made these animals different? Looking further back in time, before social defeat,  $D_L$  rats appear no different to  $D_H$  rats or non defeated rats (ND) in terms of breathing frequency. However, there is a noticeable trend for a greater reduction in breathing frequency in  $D_L$  rats during the social defeat period. This difference was not statistically significant, but it may be a sign that these animals were either more sensitive or had experienced a more intense social defeat or were less resilient. A retrospective examination of the weight curve of  $D_L$  and  $D_H$  rats in Study 1 can also be done. It reveals no apparent difference between the two groups of rats before, during or in the 10 days following social defeat.

### ***Role of the DMH and NTS 5-HT<sub>3</sub> receptors in the respiratory alterations induced by social defeat***

We know from previous work that a neuronal pathway involving the DMH plays a key role in an autonomic alteration evoked by social defeat, the inhibition of cardiac parasympathetic activity (Sévoz-Couche et al. 2013). This inhibition of cardiac parasympathetic activity, which is GABAergic and occurs on vagal preganglionic neurons, is thought to result from an activation of presynaptic vagal 5-HT<sub>3</sub> receptors in the NTS, themselves indirectly activated by the DMH (Sévoz-Couche et al. 2013). Interestingly, depressed breathing can also be obtained by the activation of an NTS-mediated GABAergic inhibition of an important medullary region involved in the central command of respiration, the retrotrapezoid/parafacial (RTN-pFRG) region (Moreira et al. 2007).

To find out if the DMH and NTS 5-HT<sub>3</sub> receptors are also involved in the bradypnea evoked by social defeat, we blocked the DMH with bilateral microinjections of muscimol, and antagonized 5-HT<sub>3</sub> NTS receptors with bilateral microinjections of granisetron. As with cardiac vagal inhibition, we found that blockade of DMH and 5-HT<sub>3</sub> NTS receptors abolished the bradypnea of defeated rats at both D10 and D30 (in D<sub>L</sub> rats). Similar results were found when granisetron was given systemically (data not shown), as 5-HT<sub>3</sub> receptor antagonists can cross the blood-brain barrier (Costall and Naylor 2004). In line with these results, systemic administration of ondansetron, another 5-HT<sub>3</sub> receptor antagonist has been shown to prevent sleep apneas (Veasey et al. 2001). This suggests that the same DMH - NTS 5-HT<sub>3</sub> neuronal pathway that mediates the cardiac vagal inhibition may also mediate the bradypnea, probably via a GABAergic inhibition of the RTN/pFRG.

Classically, an increase in respiratory activity is the characteristic feature of the physiological response to psychological stress. Some studies that investigated the effects of disinhibition of neurons within the DMH on respiratory frequency (Reynolds et al. 2008) or on phrenic nerve activity (McDowall et al. 2007), concluded that acute DMH activation induces increases in respiratory activity. Conversely, muscimol blockade of the DMH prevents the tachypnea evoked by acute stress such as a novel environment or restraint (Bondarenko et al. 2015). This discrepancy with our results is not easy to explain because the rats would almost certainly have been tachypneic and their DMH strongly activated during the social defeat. One possibility is that long term changes occurred in the DMH and/or its targets that modified the way it modulates breathing. For example the DMH could have remained active at a subthreshold level, sufficient to activate NTS 5-HT<sub>3</sub>-mediated bradypnea but too low to increase respiration



rate. This needs to be investigated further, but we have observed anecdotally that subthreshold electrical DMH stimulation that does not increase basal respiratory rate can inhibit RTN/pFRG chemoreceptor-induced increases in ventilation (personal observation).

### ***Clinical significance***

At least to our knowledge, there is no report on the long-term changes in respiration associated with post-traumatic stress disorder (PTSD). Anxiety and panic disorder are classically associated with hyperventilation (Smoller et al. 1996; Grassi et al. 2014), however our results show the opposite. This difference is perhaps due to the form of stress we applied here, ie social defeat, or to the fact that it was a repeated stress rather than a single traumatic event, hence associated with anticipation and inescapability. Nevertheless they are consistent with those described by Kinkead et al (2009) in adult rats after neonatal separation or those of Padley et al (2005) in Flinder-Sensitive rats. The long-term consequences of bradypnea are not known, but Anderson and collaborators have suggested the possibility that chronic anticipation of an avoidance task may lead to hypertension as a consequence of a decrease in respiratory rate and therefore of renal excretory function (Anderson 1998). A daily correlation between the development of hypertension and hypoventilation would help to support this hypothesis. Further work is needed, especially in PTSD patients.

In conclusion, our social defeat procedure induced long-lasting changes in breathing that lead to a chronic bradypnea. All the defeated rats were affected initially. Recovery occurred in some animals, but the bradypnea persisted in a group of sensitive rats. The central mechanisms underlying this long lasting effect include a tonic activation of the DMH that reduced breathing rate via excitation of NTS 5-HT<sub>3</sub> receptors.

### **Sources of Funding**

This work received financial support from Legs Poix (LEG1406)

### **Disclosures**

None.

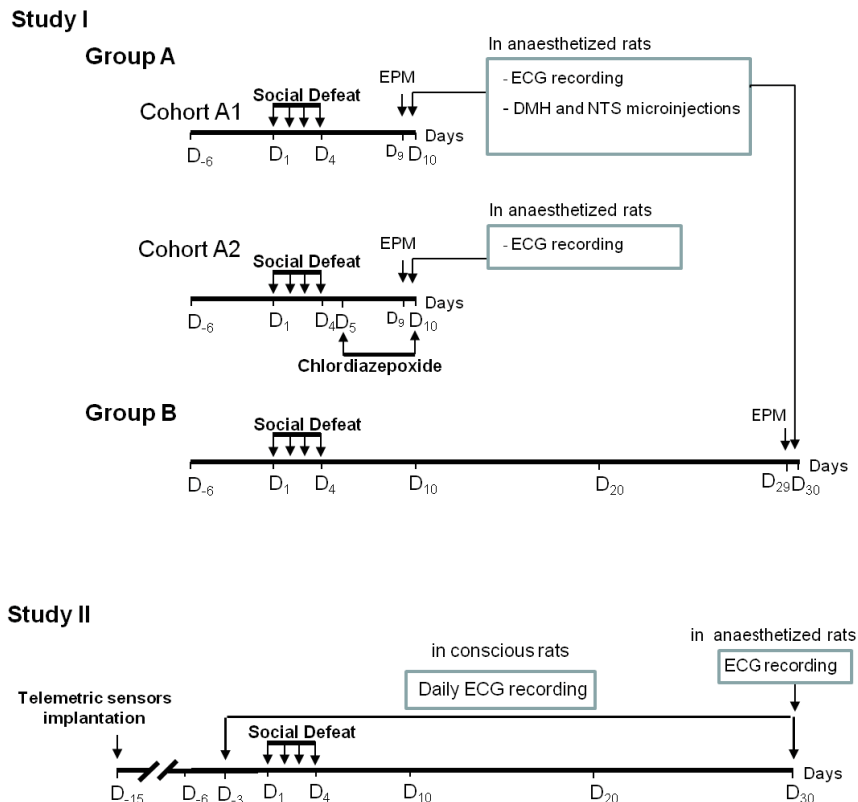
### **Acknowledgments**

Wild-type Groningen strain was generously provided by S. De Boer.

## Reference

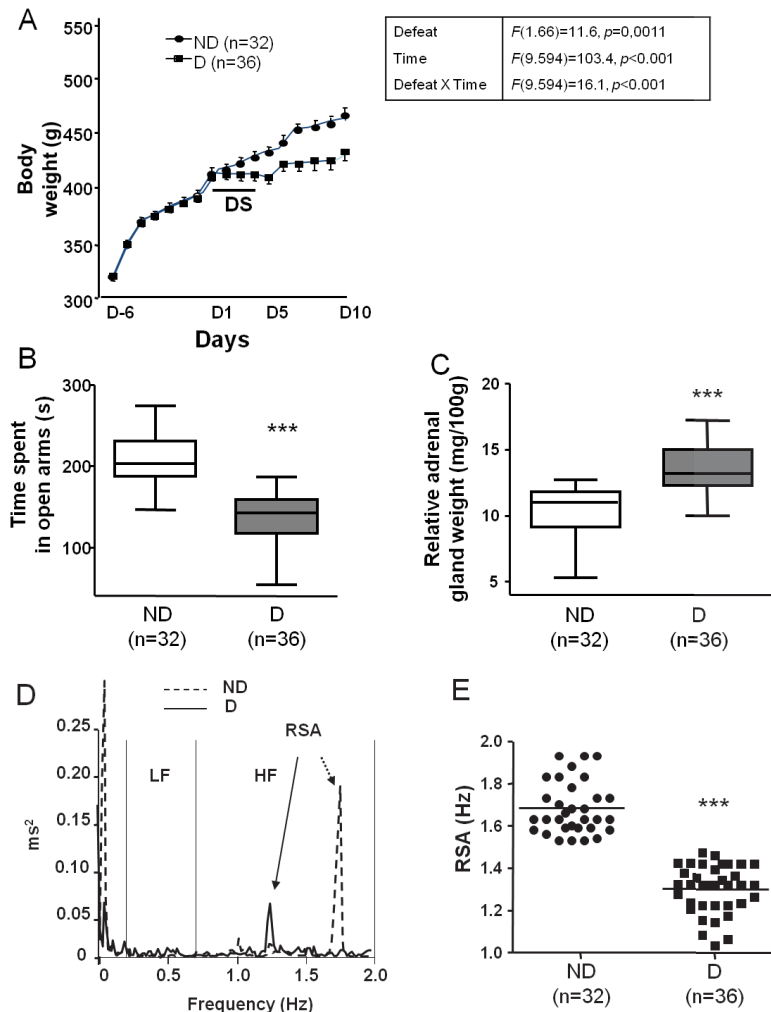
- Abelson JL, Khan S & Giardino N (2010). HPA axis, respiration and the airways in stress--a review in search of intersections. *Biol Psychol* **84**, 57–65.
- Anderson DE (1998). Cardiorenal effects of behavioral inhibition of breathing. *Biol Psychol* **49**, 151–163.
- Becker C, Thiébot MH, Touitou Y, Hamon M, Cesselin F & Benoliel JJ (2001). Enhanced cortical extracellular levels of cholecystokinin-like material in a model of anticipation of social defeat in the rat. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* **21**, 262–269.
- Berger S, Kliem A, Yeragani V & Bär K-J (2012). Cardio-respiratory coupling in untreated patients with major depression. *J Affect Disord* **139**, 166–171.
- Blugeot A, Rivat C, Bouvier E, Molet J, Mouchard A, Zeau B, Bernard C, Benoliel J-J & Becker C (2011). Vulnerability to depression: from brain neuroplasticity to identification of biomarkers. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* **31**, 12889–12899.
- Bondarenko E, Beig MI, Hodgson DM, Braga VA & Nalivaiko E (2015). Blockade of the dorsomedial hypothalamus and the perifornical area inhibits respiratory responses to arousing and stressful stimuli. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **00415**.2014.
- Brouillard C, Carrive P, Similowski T & Sevoz-Couche C (2014). Respiratory sinus arrhythmia as a surrogate measure of respiratory frequency: validity and robustness to activity in rats. *J Appl Physiol Bethesda Md 1985* **00799**.2014.
- Bryant RA, Creamer M, O'Donnell M, Silove D & McFarlane AC (2008). A multisite study of initial respiration rate and heart rate as predictors of posttraumatic stress disorder. *J Clin Psychiatry* **69**, 1694–1701.
- Costall B & Naylor RJ (2004). 5-HT<sub>3</sub> receptors. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord* **3**, 27–37.
- Denver JW, Reed SF & Porges SW (2007). Methodological issues in the quantification of respiratory sinus arrhythmia. *Biol Psychol* **74**, 286–294.
- Fontes M a. P, Xavier CH, de Menezes RCA & Dimicco JA (2011). The dorsomedial hypothalamus and the central pathways involved in the cardiovascular response to emotional stress. *Neuroscience* **184**, 64–74.
- Grassi M, Caldirola D, Di Chiaro NV, Riva A, Daccò S, Pompili M & Perna G (2014). Are respiratory abnormalities specific for panic disorder? A meta-analysis. *Neuropsychobiology* **70**, 52–60.
- Hegoburu C, Shionoya K, Garcia S, Messaoudi B, Thévenet M & Mouly A-M (2011). The RUB Cage: Respiration-Ultrasonic Vocalizations-Behavior Acquisition Setup for Assessing Emotional Memory in Rats. *Front Behav Neurosci* **5**, 25.
- Kinkead R, Montandon G, Bairam A, Lajeunesse Y & Horner R (2009). Neonatal maternal separation disrupts regulation of sleep and breathing in adult male rats. *Sleep* **32**, 1611–1620.
- McDowall LM, Horiuchi J & Dampney RAL (2007). Effects of disinhibition of neurons in the dorsomedial hypothalamus on central respiratory drive. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **293**, R1728–R1735.
- Moreira TS, Takakura AC, Colombari E & Guyenet PG (2007). Activation of 5-hydroxytryptamine type 3 receptor-expressing C-fiber vagal afferents inhibits retrotrapezoid nucleus chemoreceptors in rats. *J Neurophysiol* **98**, 3627–3637.

- Netzer F, Bernard J-F, Verberne AJM, Hamon M, Camus F, Benoliel J-J & Sévoz-Couche C (2011). Brain circuits mediating baroreflex bradycardia inhibition in rats: an anatomical and functional link between the cuneiform nucleus and the periaqueductal grey. *J Physiol* **589**, 2079–2091.
- Nishi D, Noguchi H, Yonemoto N, Nakajima S, Kim Y & Matsuoka Y (2013). Incidence and prediction of post-traumatic stress disorder at 6 months after motor vehicle accidents in Japan. *Psychosomatics* **54**, 263–271.
- Padley JR, Overstreet DH, Pilowsky PM & Goodchild AK (2005). Impaired cardiac and sympathetic autonomic control in rats differing in acetylcholine receptor sensitivity. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **289**, H1985–H1992.
- Reynolds CR, Vujisic K, Davenport PW & Hayward LF (2008). Disinhibition of the dorsomedial hypothalamus increases the frequency of augmented breaths in the anesthetized rat. *Adv Exp Med Biol* **605**, 274–278.
- Rivat C, Becker C, Blugeot A, Zeau B, Mauborgne A, Pohl M & Benoliel J-J (2010). Chronic stress induces transient spinal neuroinflammation, triggering sensory hypersensitivity and long-lasting anxiety-induced hyperalgesia. *Pain* **150**, 358–368.
- Sévoz-Couche C, Brouillard C, Camus F, Laude D, De Boer SF, Becker C & Benoliel J-J (2013). Involvement of the dorsomedial hypothalamus and the nucleus tractus solitarius in chronic cardiovascular changes associated with anxiety in rats. *J Physiol* **591**, 1871–1887.
- Sévoz-Couche C, Comet M-A, Hamon M & Laguzzi R (2003). Role of nucleus tractus solitarius 5-HT<sub>3</sub> receptors in the defense reaction-induced inhibition of the aortic baroreflex in rats. *J Neurophysiol* **90**, 2521–2530.
- Sévoz-Couche C, Nosjean A, Franc B, Hamon M & Laguzzi R (1998). Dorsal medullary 5-HT<sub>3</sub> receptors and sympathetic premotor neurones in the rat. *J Physiol* **508** ( Pt 3), 747–762.
- Sgoifo A, De Boer SF, Buwalda B, Korte-Bouws G, Tuma J, Bohus B, Zaagsma J & Koolhaas JM (1998). Vulnerability to arrhythmias during social stress in rats with different sympathovagal balance. *Am J Physiol* **275**, H460–H466.
- Sgoifo A, Stilli D, Medici D, Gallo P, Aimi B & Musso E (1996). Electrode positioning for reliable telemetry ECG recordings during social stress in unrestrained rats. *Physiol Behav* **60**, 1397–1401.
- Smoller JW, Pollack MH, Otto MW, Rosenbaum JF & Kradin RL (1996). Panic anxiety, dyspnea, and respiratory disease. Theoretical and clinical considerations. *Am J Respir Crit Care Med* **154**, 6–17.
- Thayer JF, Ahs F, Fredrikson M, Sollers JJ & Wager TD (2012). A meta-analysis of heart rate variability and neuroimaging studies: implications for heart rate variability as a marker of stress and health. *Neurosci Biobehav Rev* **36**, 747–756.
- Van Diest I, Thayer JF, Vandeputte B, Van de Woestijne KP & Van den Bergh O (2006). Anxiety and respiratory variability. *Physiol Behav* **89**, 189–195.
- Veasey SC (2003). Serotonin agonists and antagonists in obstructive sleep apnea: therapeutic potential. *Am J Respir Med Drugs Devices Interv* **2**, 21–29.
- Veasey SC, Chachkes J, Fenik P & Hendricks JC (2001). The effects of ondansetron on sleep-disordered breathing in the English bulldog. *Sleep* **24**, 155–160.
- Xavier CH, Beig MI, Ianzer D, Fontes MAP & Nalivaiko E (2013). Asymmetry in the control of cardiac performance by dorsomedial hypothalamus. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **304**, R664–R674.



**Figure 1: Protocol of social defeat.**

The experimental procedure consisted of four daily conditioning sessions (*D1–D4*) involving the same pairs of residents and intruders. There were two main studies during which RSA peak was extracted from ECG. In Study I, RSA peak was extracted under anaesthesia at i) *D10* (group A) with microinjections in the DMH and NTS (cohort A1) or with anxiolytic treatment (cohort A2), and ii) at *D30* (group B) with microinjections in the DMH and NTS. The elevated plus maze (EPM) test was performed the day before ECG recordings. In Study II, RSA peak was extracted daily in conscious rats implanted with radio-telemetric probes, and finally under anesthesia at *D30*.



**Figure 2: Long-term effects (D10) of social defeat on behavioural and respiratory parameters in non-defeated (ND) and defeated (D) rats, in study I group A cohort A1.**

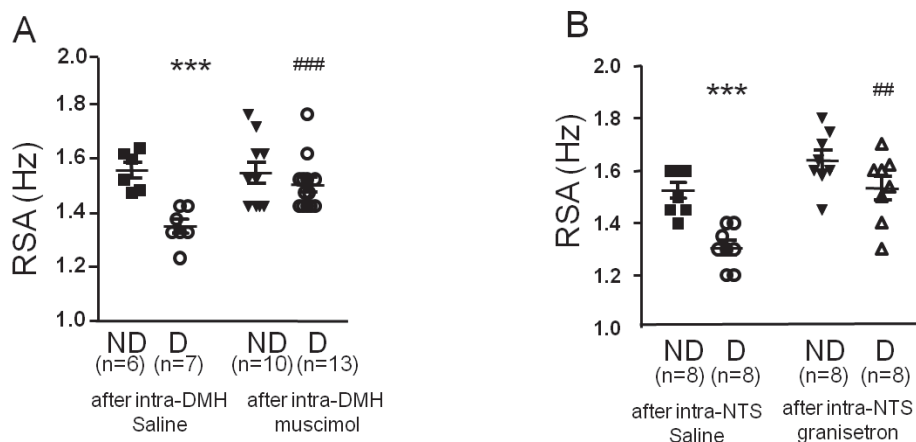
A. Daily body weight measured before, during, and after the four days of social defeat. After the last session of the social defeat, body weights of D animals were lower than those of ND rats, and that difference persisted until D10. Each point is the mean±SEM of data obtained in D and ND rats.

B. Evaluation of the anxious profile in the elevated plus maze test at D9: D animals spent less time in the open arms than ND rats. Values are the mean±SEM of data obtained in D and ND rats. \*\*\* $p < 0.001$  versus ND rats.

C. Evaluation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis: the adrenal gland weight relative to the body weight calculated was higher in D rats compared to ND animals. Values are the mean±SEM of data obtained in D and ND rats. \*\*\* $p < 0.001$  versus ND rats.

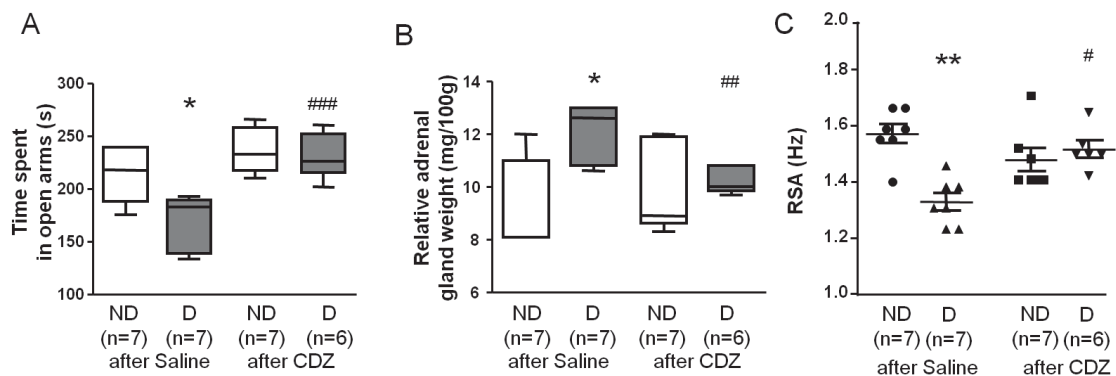
D. Spectral analysis of HRV in two representative animals under anesthesia: the RSA peak shifted to a lower frequency in the D rat (1.3Hz) compared to the ND rat (1.7 Hz), representative of a long-lasting bradypnea in stressed animals.

E. RSA peak frequency was lower in D compared to ND anesthetised animals. Values are the mean±SEM of data obtained in ND and D animals. \*\*\* $p < 0.001$  versus ND rats.



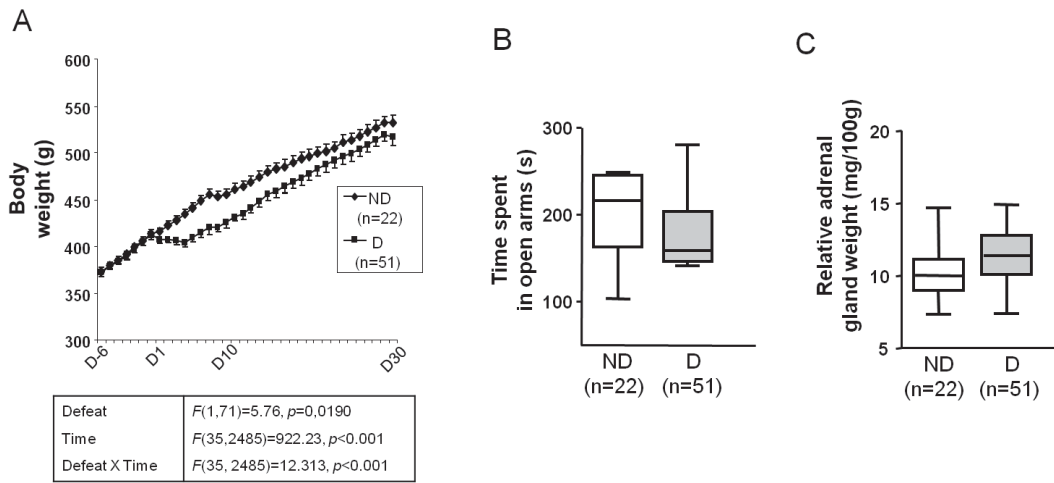
**Figure 3: Effect of blockade of DMH and NTS 5-HT<sub>3</sub> receptors on bradypnea induced by social defeat at D10, in study I group A cohort A1.**

In anesthetised rats, at D10, local microinjections of muscimol (musc, 5 mM) in the DMH (A) or granisetron (grani, 2.5 mM) in the NTS (B) reversed the decrease in RSA peak frequency normally observed in defeated rats. Values are the mean±SEM of data obtained in D and ND rats. \*\*\* $p < 0.001$  versus ND. ##  $p < 0.01$  and ###  $p < 0.001$  versus saline



**Figure 4: Effects of anxiolytic treatment on behavioural and respiratory changes induced by social defeat at D10, in study I group A cohort A2.**

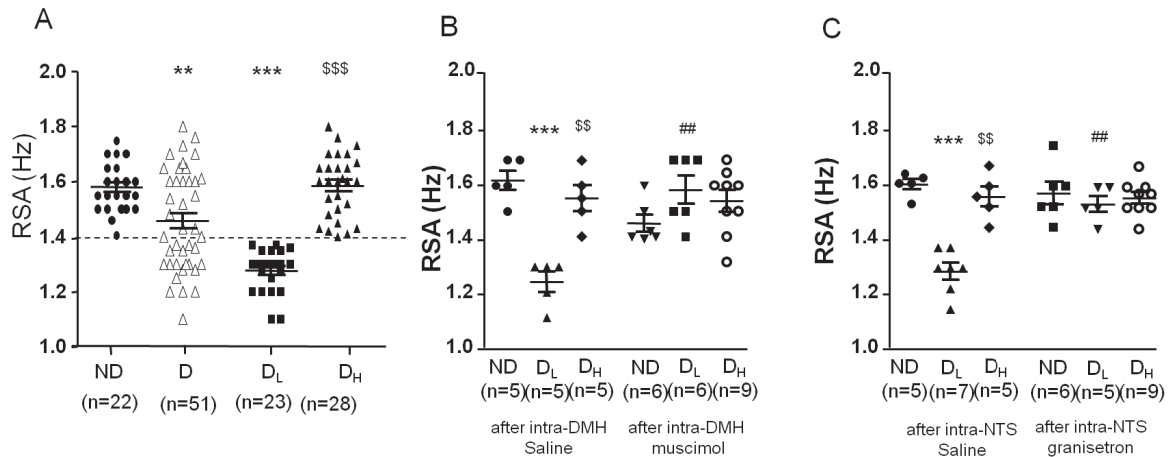
Compared to vehicle, chlordiazepoxide treatment prevented the decrease in time spent in open arms of the elevated plus maze (A), the increase in adrenal gland weight (B) and the bradypnea (C), normally observed in defeated rats at D10. Values are the mean±SEM of data obtained in D and ND rats. \* $p < 0.05$  and \*\* $p < 0.01$  versus ND, # $p < 0.05$ , ## $p < 0.01$  and ### $p < 0.001$  versus saline.



**Figure 5: Long-term effects (D30) of social defeat on behavioral parameters in non-defeated (ND) and defeated (D) rats, in study I group B.**

A. As observed previously, body weights of D animals were lower than those of ND rats during the first days of conditioning sessions and at least until D10. However, at D30, these differences disappeared. Each point is the mean±SEM of data obtained in D and ND rats.

B and C. Evaluation of the anxious profile and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis of D and ND rats in the elevated plus maze test at D29. No difference was observed in time spent in the open arms of the elevated plus maze (B) and in adrenal gland weight relative to body weight (C) between ND and D rats. Values are the mean±SEM of data obtained in D and ND rats.

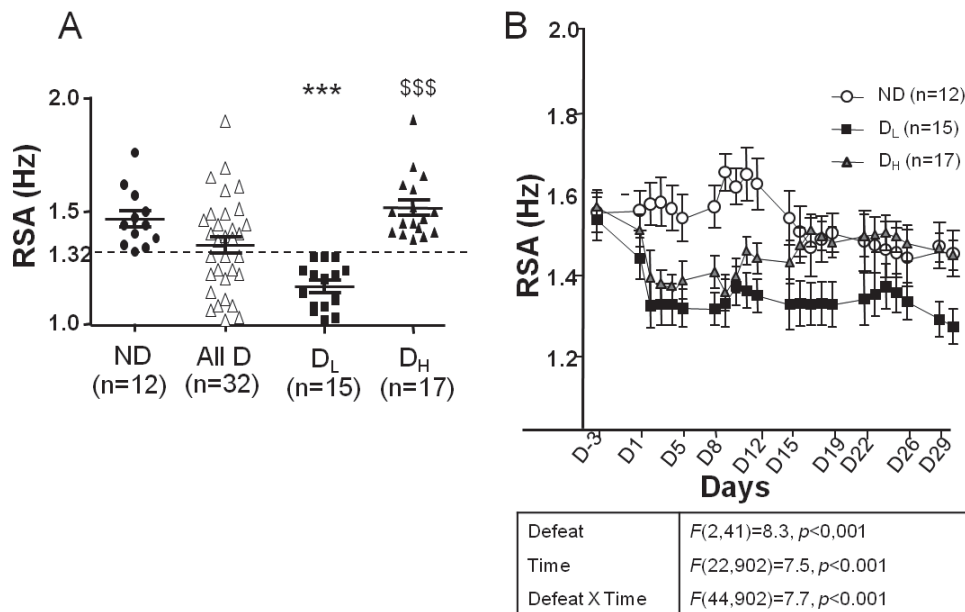


**Figure 6: Long-term effect (D30) of social defeat on respiration in non-defeated (ND) and defeated (D) rats in study I group B, and role of DMH and NTS 5-HT<sub>3</sub> receptors in this effect.**

A. At D30, RSA was still lower in D rats than in ND rats. However, D rats could be divided relative to the lowest RSA peak frequency of the ND group (1.40 Hz), resulting in two subgroups, D<sub>H</sub> (RSA above 1.40 Hz) and D<sub>L</sub> (RSA below 1.40 Hz). RSA in D<sub>H</sub> rats and ND rats were similar, while RSA in D<sub>L</sub> rats was lower than in ND and D<sub>H</sub> rats.



B and C. At D30, local microinjections of muscimol (musc, 5 mM) in the DMH (B) or granisetron (grani, 2.5 mM) in the NTS (C) reversed the decrease of RSA peak frequency normally observed in defeated rats. Values are the mean $\pm$ SEM of data obtained in D<sub>L</sub>, D<sub>H</sub> and ND rats. \*\* $p < 0.01$  and \*\*\* $p < 0.001$  versus ND, \$\$ $p < 0.01$  and \$\$\$ $p < 0.001$  versus DL rats, ## $p < 0.01$  versus saline.

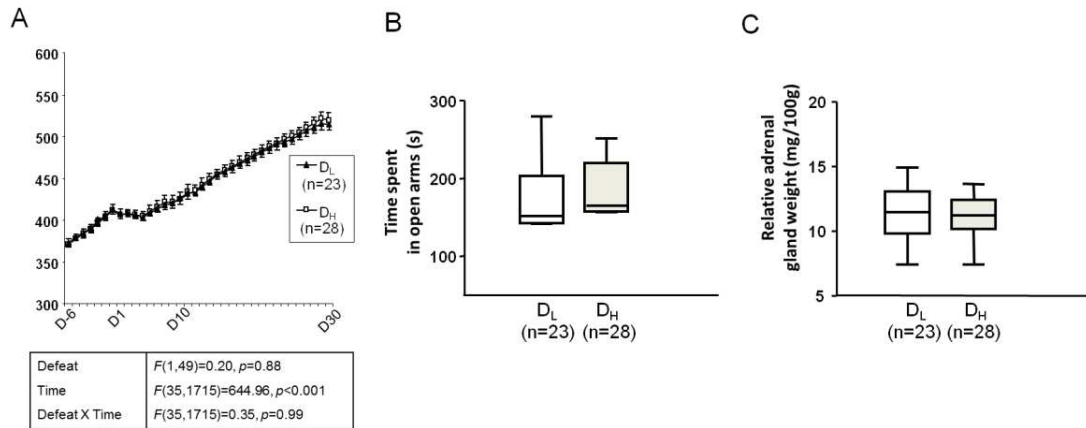


**Figure 7: Long-term effects (D30) of social defeat on respiration in non defeated (ND) and defeated (D<sub>L</sub> and D<sub>H</sub>) rats, in study II.**

A. RSA peak frequency in ND and D rats at D30 under anesthesia. D rats (All D) were divided in relative to the lowest RSA peak frequency of the ND group (1.32 Hz), resulting in two subgroups D<sub>L</sub> and D<sub>H</sub> similar to those of Study I, group B (D30). Values are the mean $\pm$ SEM of data obtained in ND, D<sub>L</sub> and D<sub>H</sub> animals. \*\*\* $p < 0.001$  versus ND rats and \$\$\$ $p < 0.001$  versus D<sub>L</sub> rats.

B. Time course of the changes in RSA peak frequency before, during after social defeat up to D30. The RSA peak frequency in D<sub>H</sub> and D<sub>L</sub> rats after social defeat was significantly lower than in ND rats as early as D2. D<sub>H</sub> rats became significantly higher than D<sub>L</sub> rats and equivalent to ND rats from D17 to D30. D<sub>L</sub> rats remained bradypneic until the end of the experiment at D30.





**Supplemental Figure: Long-term effects (D30) of social defeat on behavioural and respiratory parameters in anaesthetized defeated rats, after separation in D<sub>L</sub> and D<sub>H</sub> groups, in study I group B.**

A. Body weights of D<sub>H</sub> (RSA above 1.40 Hz) and D<sub>L</sub> (RSA below 1.40 Hz) rats were similar throughout the entire experiment. Each point is the mean±SEM of data obtained in D<sub>H</sub> and D<sub>L</sub> rats.

B and C. Evaluation of the anxious profile in the elevated plus maze test at D29 and of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis at D30 in D<sub>H</sub> and D<sub>L</sub> rats. No difference was observed in the time spent in the open arms of the elevated plus maze (B) and in the adrenal gland weight relative to body weight (C) between D<sub>H</sub> and D<sub>L</sub> rats. Values are the mean±SEM obtained in D<sub>H</sub> and D<sub>L</sub> rats.

Table 1: Statistical analysis of EPM, adrenal gland weighs and RSA in ND or DH or DL rats, in study I group B and study II based on one-way (subject) ANOVA.

Study I/Group B/ ND-DH-DL	Open arms D29	$F(2,70)=2.3, p=0.15$
	Adrenal gland weight D30	$F(2,70)=1.34, p=0.26$
	RSA D30	$F(2,70)=83.6, p<0.001$
Study II/ ND-DH-DL	Adrenal gland weight D30	$F(2,41)=2.5, p=0.10$
	RSA D30	$F(2,41)=40.076, p<0.001$

Table 2: Statistical analysis of the effects of saline and muscimol injections into the DMH on RSA, in ND and D rats in cohort A1 (group A, D10), and in ND and DH or DL rats in cohort B (D30), based on two-way (subject, treatment) ANOVA.

RSA in Study I/Group A/ Cohort A1	Defeat (ND or D) Treatment (muscimol or saline) Defeat X Treatment	$F(1,32)=13.8, p<0.001$ $F(1,32)=1.7, p=0.238$ $F(1,32)=14.3, p<0.001$
	Defeat (ND or D) Treatment (granisetron or saline) Defeat X Treatment	$F(1,28)=2.9, p=0.098$ $F(1,28)=4.5, p=0.042$ $F(1,28)=4.5, p=0.043$
RSA in Study I/Group B	Defeat (ND or DH or DL) Treatment (muscimol or saline) Defeat X Treatment	$F(2,30)=16.5, p<0.001$ $F(2,30)=2.1, p=0.15$ $F(2,30)=4.3, p=0.02$
	Defeat (ND or DH or DL) Treatment (granisetron or saline) Defeat X Treatment	$F(2,31)=10.4, p<0.001$ $F(1,31)=4.1, p=0.050$ $F(2,31)=6.0, p=0.006$

Table 3: Statistical analysis based on two-way (subject, treatment) ANOVA of the effects of saline and chlordiazepoxide on adrenal gland weight, elevated plus-maze test, and RSA, in ND (n= 7 each) and D (n= 7 and 6, respectively) rats, in cohort A2 (group A, D10).

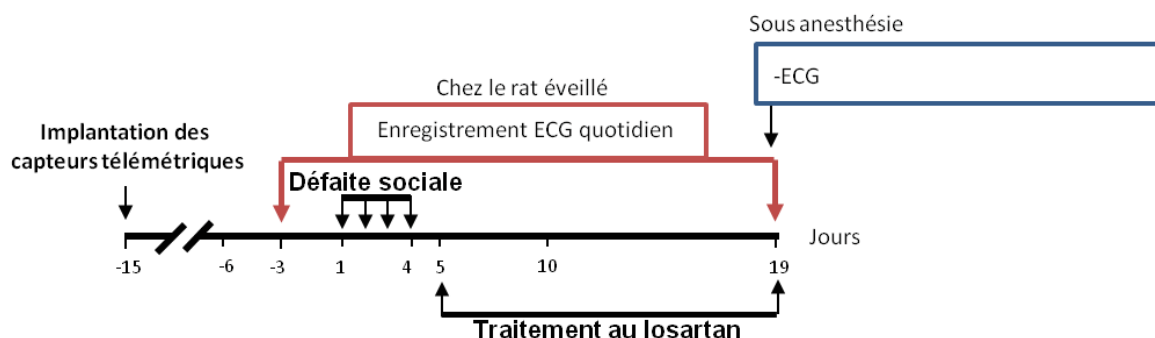
Adrenal gland weight	Defeat Treatment Defeat X Treatment	$F(1,23)=3.8; p=0.051$ $F(1,23)=0.6; p=0.450$ $F(1,23)=5.4; p=0.029$
Open arms	Defeat Treatment Defeat X Treatment	$F(1,23)=5.8; p=0.024$ $F(1,23)=19.3; p<0.001$ $F(1,23)=8.4; p=0.008$
RSA	Defeat Treatment Defeat X Treatment	$F(1,23)=7.8; p=0.009$ $F(1,23)=0.1; p=0.882$ $F(1,23)=4.6; p=0.044$

## Résultats complémentaires

Cette section présente des données s'inscrivant dans la problématique présentée dans l'étude II mais non incluses dans les publications.

### 1°) Effet du losartan sur la bradypnée.

Comme il est mentionné plus haut, nous avons montré que les récepteurs  $AT_1$  semblaient participer à l'hyperactivité sympathique induite par le stress social, et ce probablement au niveau de la RVL (résultats complémentaires de l'étude I). Comme un circuit commun semble impliquer les récepteurs 5-HT<sub>3</sub> et  $AT_1$ , probablement au niveau du NTS, pour induire le blocage du baroréflexe cardiaque en condition de stress aigu (C. Sévoz-Couche et al. 2003 ; Paton et Kasparov 1999) ou chronique (Article n°2, article n°4 et résultats complémentaires de l'étude I), nous nous sommes demandés si ce circuit commun pouvait aussi être responsable des modifications ventilatoires en stress chronique, et donc si l'activation des récepteurs  $AT_1$  pouvait aussi, comme celle des récepteurs 5-HT<sub>3</sub>, être impliquée dans l'hypoventilation induite par le stress social chez les rats D<sub>A</sub>. Nous avons mesuré le pic ASR chez les rats ayant subi le protocole avec le traitement appliqué dès la fin de la procédure de stress au losartan (Figure 36). Ainsi, à partir des enregistrements télémétriques, nous avons pu suivre l'évolution de la fréquence respiratoire via le pic ASR de D-3 à D19. Egalement, le pic ASR a été mesuré à la fin du traitement (D19) sous anesthésie (Figure 36).

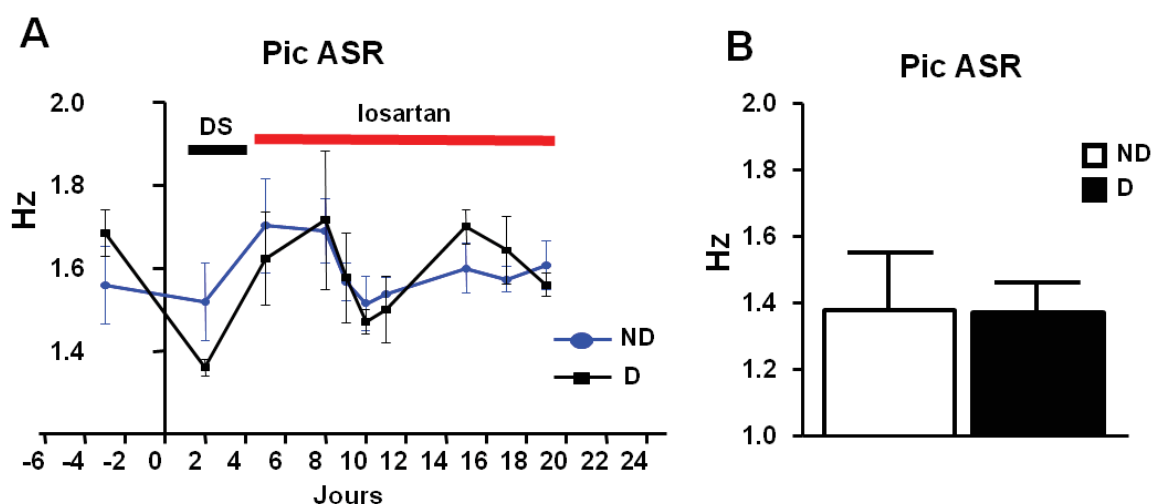


**Figure 36:** Protocole d'analyse du pic ASR en télémétrie et sous anesthésie avec le traitement au losartan

Dans l'étude II Article n°4, nous avons pu voir que les deux populations présentaient une bradypnée dès la défaite sociale mais l'une d'entre elle retrouvait une fréquence respiratoire normale à D17 (D<sub>H</sub>) alors que l'autre présentait toujours une bradypnée jusqu'à la fin du protocole (D<sub>L</sub>). Le traitement au losartan réalisé entre le premier jour après la fin de la procédure de stress (D5) et jusqu'à D19, révèle que sous anesthésie à D19, le pic ASR était

semblable entre les témoins (ND) et les stressés (D) ( $ND=1,38\pm0,18$  vs  $D=1,37\pm0,10$ , Figure 37B). Les animaux n'ont pas pu être discriminés entre  $D_L$  et  $D_H$ .

Sur l'enregistrement téléométrique, on peut voir que l'ensemble des rats stressés (D) présentaient bien une diminution du pic ASR au deuxième jour de stress (Figure 37A ; D2 :  $ND=1,52\pm0,09$  vs  $D=1,36\pm0,02$ ) mais que la fréquence respiratoire a retrouvé les valeurs contrôles dès le traitement commencé. Du fait du manque d'effectif (4 rats ND et 4 rats D), on ne peut conclure mais ces résultats sont encourageants et doivent être approfondis.

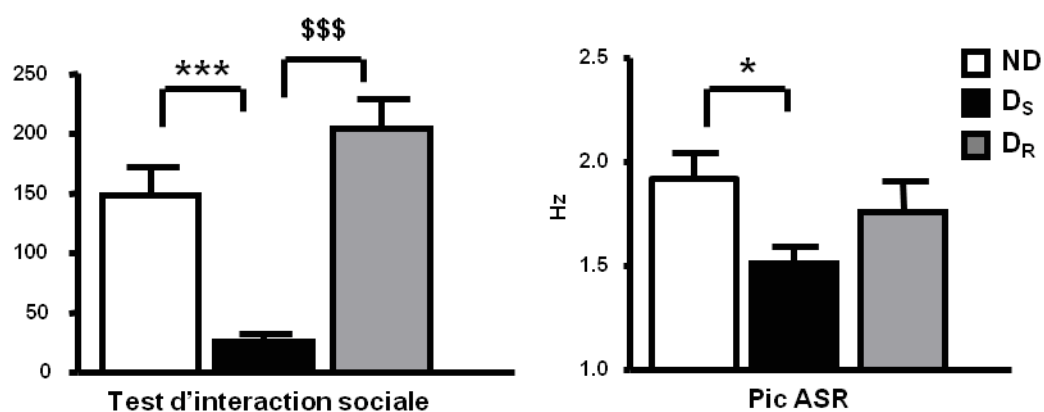


**Figure 37:** Effet du losartan sur la bradypnée. Résultats préliminaires des données téléométriques (A) et sous anesthésie (B)

## **2°) Etude du pic ASR chez la souris avec un phénotype de type dépressif**

A la suite des observations récoltées chez le rat présentant un phénotype de type anxieux, nous avons reproduit l'analyse du pic ASR chez la souris à partir du modèle induisant un phénotype de type dépressif (voir résultats complémentaires Etude I). Comme mentionné auparavant, un test d'interaction sociale a permis de catégoriser les souris stressées présentant un phénotype de type dépressif, dites sensibles au stress et appelées  $D_S$ , et les souris stressées ne présentant pas de phénotype de type dépressif, dites résistantes au stress et appelées  $D_R$ . A partir de là, nous avons mesuré le pic ASR extrait de l'ECG sous anesthésie et nous avons

observé que seule la population  $D_S$  montrait une diminution du pic ASR par rapport à la population ND, et non la population  $D_R$  (Figure 38).



**Figure 38:** Catégorisation des souris sensibles  $D_S$  et résistantes  $D_R$  au stress à partir du test d'interaction sociale et analyse du pic ASR chez ces deux populations

## CONCLUSION de l'étude II

L'Article n°3 a permis de renforcer le fait que le pic ASR peut être un substitut des techniques habituellement utilisées pour mesurer la fréquence respiratoire. L'accent ici est surtout à mettre sur le fait que la corrélation perdure même si l'activité locomotrice du rat augmente. Etant donné que les rats utilisés pour l'étude I étaient implantés avec des capteurs ECG, la fréquence respiratoire a pu y être extraite. Cela a limité les contraintes liés à un enregistrement en chambre plétysmographique quotidien et notamment le stress que cela véhicule. Ainsi, l'impact de la défaite sociale sur la fréquence respiratoire a pu être évalué en plus des altérations cardiovasculaires.

Dans l'article n°4, tout comme dans l'article n°2 de l'étude I, les rats stressés présentaient un phénotype de type anxieux à D10 qui disparaît à D30. De façon surprenante, nous avons observé que tous les rats stressés présentaient sous anesthésie une diminution de la fréquence respiratoire à D10. La prévention de cette bradypnée à D10 par un traitement anxiolytique chronique post-stress renforce ce lien entre l'anxiété et la respiration. De plus, à plus long terme (D30), seule une partie des rats stressés présentaient toujours cette bradypnée sous anesthésie, sous-population appelée D<sub>L</sub>. On retrouve donc un effet respiratoire à D30 semblable aux effets sur le système autonome et cardiovasculaire présentés dans l'étude I. Les données quotidiennes obtenues chez les rats éveillés grâce aux implants télémetriques confirment l'effet de la défaite sociale sur la fréquence respiratoire. En effet, la bradypnée apparaît à D10 chez tous les rats stressés et à D30 seulement chez le sous-groupe D<sub>L</sub>. Ces données chez les rats éveillés ont permis de visualiser le moment de différenciation entre les deux sous-groupes identifiés sous anesthésie à D30. La séparation des deux sous-populations des rats stressés a lieu à partir de D17. Les travaux précédents sur ce modèle de stress ont montré que le phénotype de type anxieux était encore présent à D15 (Rivat et al. 2010). Ainsi, on peut supposer que la bradypnée disparaît chez une partie des rats stressés en parallèle de l'état anxieux. Cependant, chez une partie des rats stressés, l'instauration d'un profil anxieux laisse des séquelles à long terme au niveau respiratoire, même lorsque ce profil a disparu.

La question qui se posait ensuite était de savoir si les mécanismes centraux impliqués dans les altérations cardiovasculaires étaient les mêmes que ceux étudiés dans l'étude I. Il s'avère que l'analyse fréquentielle de la VFC révèle que le shift du pic ASR vers les basses fréquences, donc la bradypnée, était réversée chez les rats anesthésiés par le blocage du DMH grâce au muscimol et par le blocage des récepteurs 5-HT<sub>3</sub> du NTS par le granisetron. Ceci est observé chez tous les stressés à D10 et chez les rats présentant toujours la bradypnée (sous-population

appelée D<sub>L</sub>) à D30. Ainsi, les mécanismes impliqués dans les altérations cardiovasculaires et autonomiques prennent également part dans la bradypnée observée chez les rats stressés.

Nos études portant sur la souris et présentées dans les résultats complémentaires semblent indiquer la même conclusion. En effet, les souris présentant un phénotype de type dépressif (D<sub>S</sub>) présentent une diminution de la fréquence respiratoire basale et les récepteurs 5-HT<sub>3</sub> du NTS semblent être impliqués. En effet, chez les souris D<sub>S</sub>, une surexpression de ces récepteurs a été trouvée au niveau du NTS.

De plus, le traitement impliquant le losartan, antagoniste des récepteurs AT<sub>1</sub>, reverse aussi l'apparition à long-terme de la bradypnée. On peut supposer qu'un circuit commun impliquant les récepteurs AT<sub>1</sub> et 5-HT<sub>3</sub> du NTS soit impliqué dans l'installation d'une telle modification respiratoire.

**En conclusion, cette seconde étude révèle donc qu'un stress chronique peut induire des modifications respiratoires à long terme, en parallèle des modifications cardiovasculaires exposées dans l'étude I. De plus, les mécanismes centraux impliqués sont semblables. En effet, les résultats obtenus ici révèlent une activation chronique du DMH et des récepteurs 5-HT<sub>3</sub> du NTS dans la bradypnée observée chez les rats stressés. Les récepteurs AT<sub>1</sub> semblent être impliqués dans cet effet.**

## **DISCUSSION GENERALE ET** **PERSPECTIVES**



## I) Discussion

### A) Introduction

Le stress est physiologiquement indispensable pour la survie d'un organisme, pour faire face et s'adapter à son environnement. On parle alors de « réaction de défense ». Cela engendre notamment des réponses cardiovasculaires assurées par une hyperactivité sympathique à l'origine d'une augmentation de la FC et de la PA. Le maintien de ces modifications cardiovasculaires pendant la durée du stress s'accompagne d'une inhibition de la composante parasympathique du baroréflexe. Ces modifications physiologiques s'accompagnent d'une augmentation de la fréquence respiratoire. Le noyau dorsomédian de l'hypothalamus (DMH) apparaît comme une structure clé de la réaction de défense. En effet, son inhibition préalable abolit toutes réponses neuroendocriniennes, cardiovasculaires et respiratoires induites par un stimulus stressant (Stotz-Potter et al. 1996 ; DiMicco et al. 2002; Bondarenko et al. 2015).

Le stress chronique est connu pour induire des troubles anxiodépressifs. Au niveau clinique, ces pathologies psychiatriques sont souvent liées à des modifications cardiovasculaires et respiratoires. En effet, de nombreuses études ont notamment rapportés que les patients anxiodépressifs ont une VFC diminuée avec une altération de la balance autonome en faveur d'une hyperactivité sympathique et la composante cardio-vagale du baroréflexe était aussi réduite (Kawachi et al. 1995 ; Thayer and Lane 2000 ; Cohen and Benjamin 2006; Mellman et al. 2004 ; Kawachi et al. 1995; Yeragani et al. 1993; Chang et al. 2013). Cette défaillance du baroréflexe cardio-vagale peut d'ailleurs expliquer que l'on retrouve une hyperactivité sympathique persistante chez les patients anxiodépressifs à l'origine d'une hypertension (Bajkó et al. 2012). Il est maintenant considéré qu'une diminution persistante de la VFC couplé à une réduction de la sensibilité du baroréflexe cardio-vagale est considérée comme un indice de risque accrue de survenue de pathologies cardiaques (hypertrophie ventriculaire, infarctus du myocarde) ainsi que d'évènements rythmiques cardiaques (fibrillations ventriculaires) qui peuvent être à l'origine de survenue de mort soudaine (Kleiger et al. 1987; Yi et al. 1997; La Rovere et al. 1998). La présence d'une VFC réduite et d'un baroréflexe cardiaque altéré peut expliquer la forte prévalence de pathologies cardiaques et de décès d'origine cardiaque chez les patients anxiodépressifs (Rabins et al. 1985).

**Cependant les mécanismes impliqués dans de telles modifications cardiaques, et notamment la réponse réflexe cardiaque, étaient encore méconnus. Le premier objectif**

**de ma thèse était donc de modéliser les atteintes cardiovasculaires observées chez les patients atteints de troubles anxiodépressifs.**

Or, si de nombreux modèles de stress chronique existent (stress de contention, chocs électriques, modèles génétiques, ...), peu induisent toutes les altérations que nous venons de citer. En effet, si la réduction de VFC apparaît dans de nombreuses études, cela a été le plus souvent réalisé pendant le stress ou juste après (Grippe et al. 2008b; Porter et al. 2004). De plus, seule la procédure de stress social peut induire des modifications électriques au niveau du cœur à l'origine de la survenue d'arythmies ventriculaires (Carnevali et al. 2013). Mais cette étude n'a pas démontré de modifications anatomo-morphologiques au niveau cardiaque. De plus, la réduction du baroréflexe cardiaque et du tonus parasympathique n'est retrouvé dans aucun modèle, même lors de la défaite sociale (Sgoifo et al. 2002; Beig et al. 2009).

**Nous avons donc entrepris nos études en utilisant un modèle de stress social validé récemment comme induisant un état d'anxiété, basé sur la défaite sociale et avec la particularité d'insister sur « l'anticipation du stress ».** En effet, les animaux sont placés face aux agresseurs juste avant la phase de confrontation, ils savent donc que celle-ci surviendra dans la demi-heure suivante (ils ne sont donc pas dans l'incertitude comme d'autres modèles d'anticipation, et ressentent le caractère « inévitable » de cette procédure). Ceci a l'avantage d'être proche de ce qui peut exister chez l'homme. Ce modèle a non seulement été validé comme induisant une activation importante de l'axe du stress, mais surtout, cette suractivation est beaucoup plus puissante que celle obtenue chez les autres modèles, puisque le taux de corticostérone est augmenté de façon très importante.

Pour étudier les mécanismes qui pourraient intervenir dans ces modifications cardiovasculaires induites par un stress chronique, et partant du principe que celles-ci étaient semblables à ce qu'on observe en condition de stress aigu, c'est-à-dire, une hyperactivité sympathique couplée à une inhibition du baroréflexe, nous avons cherché à savoir si les mêmes mécanismes centraux étaient impliqués, et si notamment l'activation du DMH en était l'origine. D'autre part des études du laboratoire avaient montré que l'altération du baroréflexe était due à la stimulation des récepteurs 5-HT<sub>3</sub> du NTS, induite indirectement par le DMH (Netzer et al. 2011; Sévoz-Couche et al. 2003). **L'un des objectifs de la thèse était donc de déterminer si le DMH pouvait être à l'origine des modifications cardiovasculaires induites par un stress chronique basé sur l'anticipation, avec une attention particulière sur l'implication des récepteurs 5-HT<sub>3</sub> du NTS en aval du DMH, pour expliquer la réduction du baroréflexe cardiaque.**

D'autre part, un stress oxydant induit par l'angiotensine II et aboutissant à une augmentation de la protéine BDNF dans des structures bulbaires impliquées dans la régulation cardiovasculaire a été observé dans un modèle d'hypertension (Chan et al. 2010). **Nous avons donc analysé l'implication de l'angiotensine II et du BDNF dans les altérations cardiovasculaires induites par le stress social.**

Les effets des troubles anxiodépressifs au niveau de la fonction respiratoire sont plus obscurs et moins étudiés. On retrouve souvent une hyperventilation dans des situations anxieuses (Smoller et al. 1996; Grassi et al. 2013; Masaoka et al. 2004), et elle serait à l'origine de symptômes somatiques qui eux-mêmes sont interprétés comme étant de nature « catastrophique », ce qui en retour augmente l'état d'anxiété (Ley 1985). L'hyperventilation se manifeste par une augmentation de la fréquence respiratoire et du volume courant (Yeragani et al. 2000; Masaoka et al. 2004; Grassi et al. 2013) et est corrélée au degré d'anxiété (Burkhardt et al. 2010) ou d'attaque de panique (Yeragani et al. 2000). Au contraire, les pathologies dépressives sont associées à un pattern respiratoire différent. Un syndrome dépressif ne semble pas causer de modification de la fréquence respiratoire (Berger et al. 2012). Cependant, lorsque les patients sont atteints de mélancolie, on observe une diminution de la fréquence respiratoire (Averill 1969). Il est à noter que les troubles anxieux comme les troubles dépressifs présentent une forte prévalence avec les pathologies respiratoires telles que les apnées obstructives du sommeil ou les apnées centrales (Krakow et al. 2015; Cheng et al. 2013). La présence de ces apnées indique donc plutôt une dépression des fonctions respiratoires au repos. Chez l'animal, peu d'études ont étudié cette relation. Il semble que des animaux hyperanxieux aient une fréquence respiratoire augmentée (Carnevali et al. 2013), mais une étude sur l'effet des chocs électriques sur la respiration montre que si une session augmente la ventilation, la répétition de ces sessions induit au contraire une hypoventilation (Pavlova and Rysakova 2013; Isom and Elshowihy 1982). **Nous avons donc évalué, en parallèle des paramètres cardiovasculaires, l'effet d'un stress chronique sur la fréquence respiratoire, et étudié l'influence du DMH et des récepteurs 5-HT<sub>3</sub> du NTS sur cet effet. L'angiotensine II dans cet effet a aussi été analysée.**

## B) Validation des méthodes

- *Modèle de stress social basé sur l'anticipation*

Le modèle utilisé pour modéliser un stress pathologique au cours de mes travaux a été validé par des études antérieures comme induisant un phénotype de type anxieux chez le rat 5 jours après la fin de la dernière confrontation ou D9 (Blugeot et al., 2011; Rivat et al., 2010; Sévoz-Couche et al., 2013), qui perdure jusqu'à D15 (Rivat et al. 2010) mais disparaît à D30 (Blugeot et al. 2011). Il présente la particularité d'être basé sur un principe d'anticipation sociale et est donc bien représentatif de l'étiologie de l'anxiété chez l'humain. Au cours de mes travaux de thèse, nous avons effectivement obtenu par ce modèle un effet stressant. La prise de poids des animaux subissant la procédure expérimentale était diminuée par rapport à celle des animaux témoins. De plus, nous avons bien constaté une suractivation de l'axe HHS. En effet, à D10, le poids des glandes surrénales étaient bien supérieur chez les animaux ayant subi un stress par rapport à celui des animaux contrôles. Enfin, nous avons bel et bien observé à D9 un phénotype de type anxieux chez les rats ayant subi la défaite sociale. Ce phénotype a été mesuré selon deux critères, à savoir le temps passé dans les bras ouverts du labyrinthe en croix, ce temps étant diminué (ce qui montre une diminution de la volonté d'exploration des animaux) chez les animaux stressés. Un traitement anxiolytique ayant prévenu ces modifications a permis de conforter le fait que ces altérations comportementales et physiologiques étaient induites par l'instauration d'un état d'anxiété. Par conséquent, le modèle utilisé a bien répondu aux trois critères d'homologie, d'isomorphisme et de prédiction attendu dans la modélisation expérimentale.

- *L'arythmie sinusale respiratoire (ASR) comme reflet de la fréquence respiratoire*

La VFC est communément étudiée pour déterminer la fonctionnalité du système nerveux autonome, et donc de la balance sympathovagale. Elle est déterminée par l'analyse temporelle et spectrale de l'intervalle de temps entre deux battements (intervalle RR), extrait de l'ECG. Il est communément admis que l'analyse spectrale de la VFC fait apparaître deux bandes de fréquence différentes, une de basse fréquence appelée LF et une de haute fréquence appelée HF (Pagani et al. 1986). La bande LF résulte des influences sympathiques et parasympathiques sur le cœur, alors que la bande HF est d'origine exclusivement vagale puisqu'elle disparaît lorsqu'on administre de l'atropine, antagoniste des récepteurs à l'acétylcholine (Ohmura et al. 2001). Le ratio des aires sous la courbe des bandes LF et HF (LF/HF) et la bande LF normalisée (LFnu) sont des indicateurs classiques de l'activation sympathique, alors que la bande HF et HFnu sont analysées pour étudier le tonus

parasympathiques (Denver et al. 2007; Kuwahara et al. 1994). Or la bande HF, si elle est modulée par le tonus vagal, est en fait le reflet de l'influence de la respiration sur le cœur. Cette bande est aussi appelée arythmie sinusale respiratoire (ASR). La FC varie au cours de l'inspiration (augmentation) et de l'expiration (diminution). En effet, lors de l'inspiration (phase active de la respiration), les mécanorécepteurs sino-atriaux sont activés, et vont influencer d'une part les neurones sympathoexcitateurs de la RVL (Molkov et al. 2010; Eckberg 2003) et d'autre part inhiber les neurones pré moteurs parasympathiques qui normalement ralentissent le cœur. Au contraire, lors de l'expiration, le baroréflexe sera laissé libre d'être activé et le tonus parasympathique est augmenté. De plus, les neurones de deuxième ordre du baroréflexe activent les neurones post-inspiratoires de la CCR pour faciliter ce passage à l'expiration. Ainsi, l'ASR, constitue un moyen d'explorer non seulement le tonus parasympathique, mais aussi d'explorer indirectement la fréquence respiratoire. En effet, il est admis que le pic majeur apparu dans l'ASR est le reflet de ces changements expiratoires et donc du cycle respiratoire. Plusieurs études ont rapporté ce constat au niveau clinique et expérimental (Denver et al. 2007; Boychuk and Hayward 2011). Cependant, dans toutes ces études, les comparaisons ont été réalisées de façon contrainte, à partir de simple régression linéaire et uniquement en absence totale d'activité.

**Notre but, puisque nous voulions étudier la fréquence respiratoire non seulement chez l'animal anesthésié mais aussi chez le rat éveillé laissé libre de toute contrainte, après application d'un stress chronique, était tout d'abord de valider cette corrélation entre pic ASR et fréquence respiratoire dans différentes conditions : avec ou sans anesthésie, avec ou sans activité.**

Nous avons donc analysé cette corrélation par la méthode de Passing-Bablok. Cette méthode présente l'avantage d'être indépendante des hypothèses de la régression linéaire classique (Fuhrman and Chouaïd 2004). L'analyse par Passing-Bablok est souvent utilisée pour comparer deux techniques mesurant la même variable. Dans notre étude, la fréquence respiratoire obtenue avec le pic ASR est confrontée à la fréquence respiratoire obtenue soit par un pneumotachographe chez l'animal anesthésié soit par enregistrement subpleural chez l'animal vigile. La méthode de Passing-Bablok révèle ainsi que dans ces deux conditions, le pic ASR est parfaitement représentatif de la fréquence respiratoire puisque la pente et l'interception de la droite de régression sont dans les intervalles de confiance relatifs (95%). De plus, l'activité n'influe pas sur cette corrélation chez l'animal éveillé. Ces observations ont été également validées en utilisant une autre méthode de corrélation, l'Altman-Bland plot. Cette méthode permet également d'étudier la concordance entre deux mesures de la même

grandeur en les visualisant sur un graphique représentant l'écart entre chaque couple de points (en ordonnées) en fonction de la moyenne pour chaque couple de points (en abscisse), et a l'avantage de faire apparaître les biais.

Par ailleurs, l'analyse de cette corrélation sur des séquences contenant des patterns respiratoires irréguliers tels que le sniffing a été réalisée. Le sniffing dure en général quelques secondes (10s maximum) sur les 90 secondes du segment analysé. Or, lors d'une période de sniffing, la fréquence respiratoire est en moyenne à 7 Hz, mais aucun pic au-delà de 4 Hz n'a été observable sur le spectre, et la moyenne de la fréquence respiratoire sur les 90s ne tient pas en compte ces périodes de sniffing. Ceci confirme les observations de recherches antérieures sur ce sujet (Hirsch and Bishop 1981). Le sniffing correspond à des séries d'inspirations rapides et forcées suivi de petites expirations passives (Tomori et al. 1998), ainsi, pendant ces périodes de sniffing, il est possible qu'il n'y ait pas d'activation des mécanorécepteurs pulmonaires expliquant que l'ASR n'est pas impliquée lors de sniffing (Taha et al. 1995) et donc que sa fréquence sur le spectre de la VFC n'est pas modifié. De plus, il apparaît logique que la fréquence de sniffing de 7 Hz, trop proche de celle de la FC (5Hz) ne puisse être décelée sur une analyse fréquentielle de l'intervalle RR.

**Nous avons donc validé le fait que nous puissions étudier la fréquence respiratoire à partir du pic ASR. Celui-ci, obtenu simplement à partir de l'ECG, constitue donc un moyen non invasif et simple d'utilisation pour mesurer la fréquence respiratoire.**

### **C) Modélisation du lien entre l'anxiété et les troubles cardiorespiratoires**

Notre étude a porté ici sur l'exploration des fonctions cardiovasculaires et respiratoires dans des conditions de stress chronique. Par ailleurs, les études ont été réalisées à distance du stress afin de ne pas biaiser les données par le stress en lui-même, et donc éviter de se retrouver en condition de stress aigu.

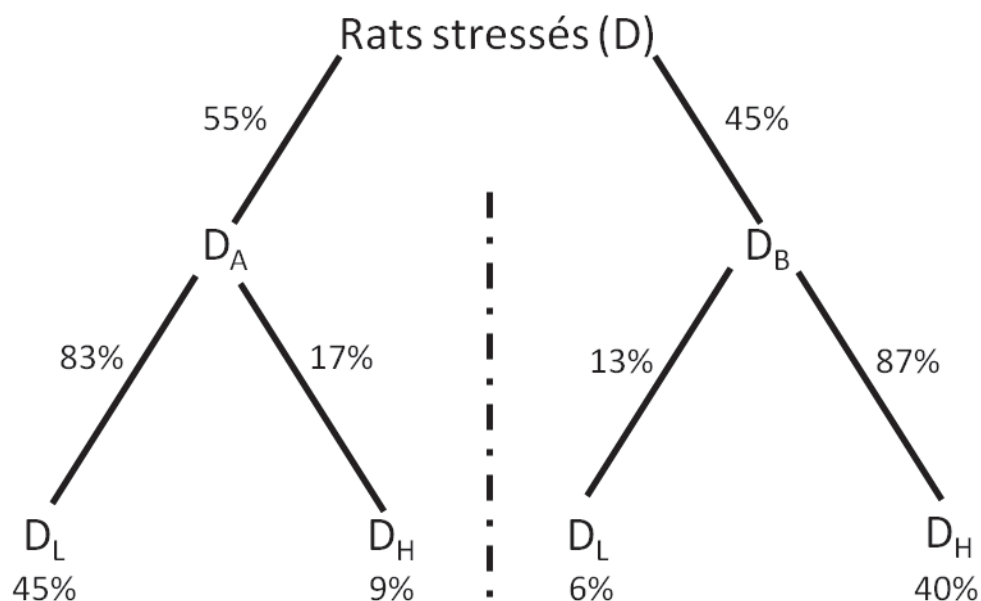
Lors de notre étude, lorsqu'un profil de type anxieux a été induit à distance du stress (soit à D10), les rats stressés présentaient une hyperactivation sympathique, observable par une hypertension, une augmentation de la FC et une diminution de la variabilité de la VFC. Pour la première fois nous avons pu montrer que la défaite sociale basée sur l'anticipation induisait bel et bien une inhibition du baroréflexe cardiaque et une réduction du tonus vagal. Au niveau respiratoire, l'effet de l'anxiété est différent de ce que l'on pouvait attendre

puisque les rats stressés présentent une bradypnée à D10. La notion de réelle hypoventilation ne peut clairement être mentionnée ici, puisque celle-ci impliquerait que le volume courant ( $V_T$ ) soit identique ou diminué, et que nous n'avons pas enregistré ce paramètre dans la plupart de nos études. Cependant, il faut noter que dans quelques expériences réalisées avec l'enregistrement de la respiration sous-pleurale, il semble que le volume sous-pleural correspondant à chaque cycle soit diminué chez les animaux stressés. Même si ces expériences ont été réalisées sur un petit groupe d'animaux seulement, on peut envisager que la bradypnée observée chez nos animaux soit le reflet d'une réelle hypoventilation. Il faut rappeler que certaines études expérimentales basées sur un protocole de stress semblable au nôtre, à savoir sur une anticipation répétée, ont observé une réduction de l'activité respiratoire. Ainsi des chocs électriques répétés, dont l'animal pouvait anticiper l'arrivée, induit une hypoventilation (Isom and Elshowihy 1982). De plus, une étude expérimentale et clinique a montré une association entre l'anticipation d'une tâche stressante s'accompagne d'une hypoventilation (Anderson 1998).

En regardant à plus long terme, soit 25 jours post-stress (D30), nous avons pu nous apercevoir que les altérations cardiovasculaires persistaient chez une partie (environ 50%) des animaux et ce malgré le fait que le phénotype de type anxieux ne soit plus présent à ce stade (plus de différence de poids des glandes surrénales et de temps passé dans les bras du labyrinthe en croix par rapport aux animaux témoins). Ces animaux avaient la particularité d'être caractérisés par un ratio LF/HF très haut par rapport aux contrôles et aux autres animaux. Nous avons donc appelé ces rats  $D_A$  pour un ratio « Above » (donc supérieur) à la valeur maximale du ratio des rats contrôles (les autres rats ayant été stressés mais ayant un ratio « Below » (donc inférieur) à la valeur maximale du ratio des rats contrôles étant appelés  $D_B$ ). Ces animaux  $D_A$  présentaient non seulement une activité sympathique très importante, mais également une hypertrophie du myocarde, contrairement aux rats  $D_B$ . Sur le plan respiratoire, la bradypnée persiste aussi à D30 chez environ 50% des animaux ayant subi la procédure de stress. Ce sous-groupe, avec un pic ASR de fréquence basse ou « Low » a été appelé  $D_L$ .

Il existe donc un lien probable entre les altérations cardiovasculaires et respiratoires. Ainsi, lorsque nous avons évalué, chez le rat anesthésié, la proportion d'animaux ayant un pic ASR bas chez les animaux ayant un ratio LF/HF haut, il apparaît une large proportion (83%) d'animaux  $D_L$  chez les animaux  $D_A$  (Figure 39). Ainsi, sur la totalité des rats stressés, 45% présentent les altérations cardiovasculaires et la bradypnée ( $D_A + D_L$ ).





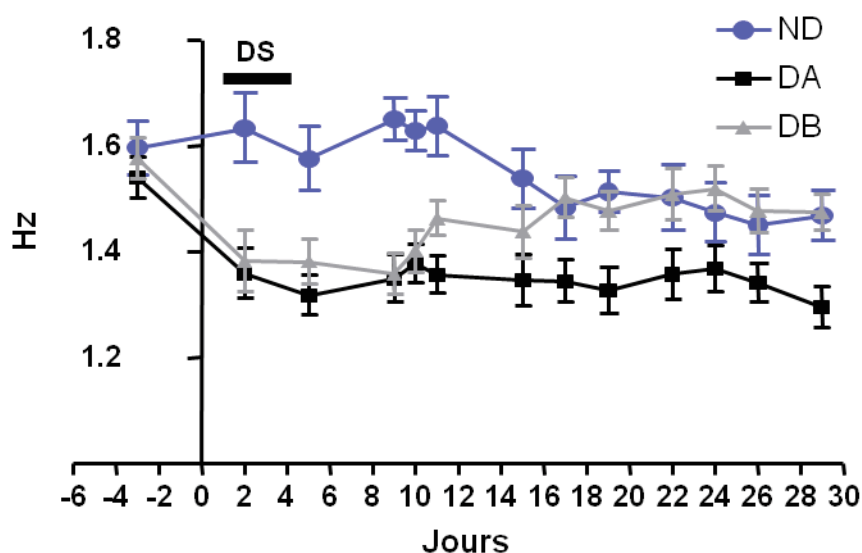
**Figure 39:** Proportion à D30 des sous-populations D<sub>L</sub> et D<sub>H</sub> au sein des groupes D<sub>A</sub> et D<sub>B</sub>

Les mêmes observations ont été obtenues chez les souris soumises au stress social. Les souris « susceptibles » étaient caractérisées par une hyperactivité sympathique associée à une réduction du baroréflexe et une bradypnée. Nous pouvons donc penser à ce stade qu'il existe une réelle relation entre altération cardiovasculaire et respiratoire chez l'animal ayant subi un stress, et on peut émettre plusieurs hypothèses sur cette relation :

- Soit l'hyperactivité sympathique et la bradypnée sont des effets parallèles du stress, qui peuvent impliquer des circuits initiaux communs mais indépendants l'un de l'autre,
- Soit l'hyperactivité sympathique peut induire une hypoventilation compensatrice pour diminuer la charge viscérale et essayer de réduire la FC et le débit cardiaque pour diminuer la PA,
- Soit l'hypoventilation peut induire (ou au moins aggraver) l'hyperactivité sympathique. Une étude d'Anderson (1998) va dans ce sens. En effet, Anderson et ses collaborateurs ont évoqué la possibilité qu'une anticipation chronique puisse mener au développement d'une hypertension comme conséquence d'une diminution de la fréquence respiratoire. L'hypoventilation observée mènerait à une augmentation de la P<sub>CO2</sub> et à une alcalose métabolique, qui induirait une inhibition de la sécrétion rénale de sodium et de la pompe Na/K/ATPase à l'origine d'une augmentation de la PA (Anderson 1998; Anderson and Chesney 2002).



Cependant l'étude rétrospective des altérations cardiorespiratoires chez les animaux  $D_A/D_B$  et  $D_L/D_H$ , au contraire, ne va pas dans le sens des deux dernières hypothèses. En effet, il semble que les modifications débutent chez tous les animaux en même temps et diffèrent ensuite dans leur récupération chez les animaux  $D_B$  et  $D_H$ . En effet, l'augmentation du ratio LF/HF chez les rats  $D_A$  et  $D_B$  est concomitante avec la diminution du pic ASR chez les rats  $D_L$  et  $D_H$  (dès D2), il n'y a donc pas de décalage dans l'apparition de ces altérations. De plus, le ratio retrouve des valeurs proches de celles des témoins dès la fin du stress social chez les rats  $D_B$ , alors que les rats  $D_H$  retrouvent des valeurs du pic ASR proches des valeurs contrôles vers D17 seulement. Pour confirmer ce fait, une analyse des modifications quotidiennes des pics ASR chez les animaux  $D_A$  et  $D_B$  montre bien que les pics ASR sont réduits jusqu'à D30 chez les rats  $D_A$ , et qu'ils sont réduits chez les rats  $D_B$  jusqu'à D17 avant de remonter vers des valeurs normales (alors que, pour rappel, le ratio LF/HF est redescendu vers des valeurs normales vers D4) (Figure 40).



**Figure 40:** Modification du pic ASR au sein des sous-groupes  $D_A/D_B$

Le même profil est retrouvé quand on regarde l'évolution de la PA, et en particulier de la PA systolique, ainsi que de la fréquence cardiaque. Cependant, il est à noter que chez les animaux  $D_A$ , les valeurs de PA et de fréquence cardiaque reviennent plus rapidement à la normale, ce qui montre que des circuits compensatoires apparaissent. **Il semble donc que les altérations cardiorespiratoires soient induites de façon associées mais indépendantes par le stress social.**

L'étude rétrospective a également révélé deux faits importants :

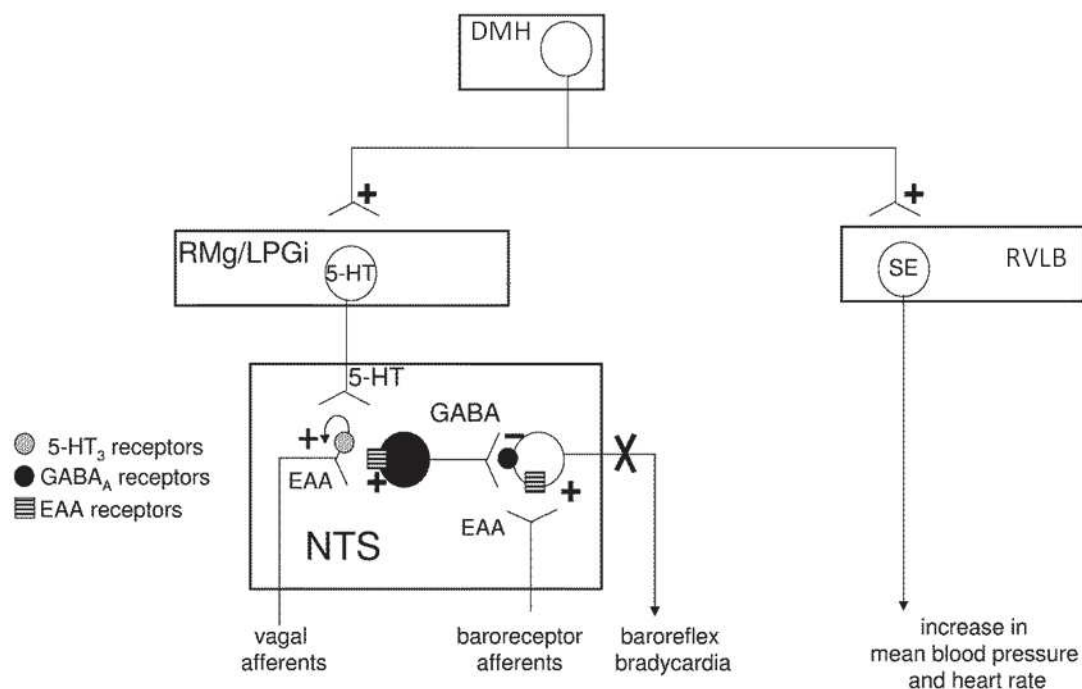
- On pourrait penser que les différences cardiorespiratoires entre les sous-groupes d'animaux pourraient s'expliquer par des facteurs antérieurs à la défaite sociale comme par exemple, l'environnement maternel ou la position hiérarchique au sein de la fratrie (Macrì et al. 2009; Trombini et al. 2012). Cependant, on ne remarque aucune différence pour les valeurs du ratio LF/HF entre les animaux ND, D<sub>A</sub> et D<sub>B</sub>, ni pour les valeurs du pic ASR entre les rats ND, D<sub>L</sub> et D<sub>H</sub>, en amont de la défaite sociale, à D-3.
- Les rats D<sub>A</sub> caractérisés par un ratio LF/HF supérieur aux autres groupes d'animaux, ainsi que par un tonus vagal réduit, sont plus susceptibles que les autres groupes d'animaux à subir l'apparition d'arythmies ventriculaires à long terme. En effet, si les rats D<sub>A</sub> et D<sub>B</sub> présentent une augmentation du nombre d'arythmies dès le début de la défaite sociale, ce nombre augmenté persiste chez les rats D<sub>A</sub> et revient à des valeurs contrôles chez les rats D<sub>B</sub> vers D15.

#### **D) Identification du rôle du DMH et des récepteurs 5-HT<sub>3</sub> du NTS**

A court terme (D10) et à long terme (D30) après la défaite sociale, l'inhibition du DMH reverse l'ensemble des modifications cardiovasculaires observés chez les rats anesthésiés. En effet, cela diminue la PA et la fréquence cardiaque, supprime l'augmentation des paramètres sympathiques de la VFC, et restaure la fonctionnalité cardio-vagale du baroréflexe. On sait que l'activation du DMH est responsable des changements comportementaux et physiologiques typiques d'une réaction à un stimulus stressant (Chapitre II, III)D ). Au niveau cardiovasculaire, le circuit neuronal est bien décrit dans la littérature avec des connections excitatrices directes vers la RVL, à l'origine d'une suractivation du tonus sympathique (Fontes et al. 2001). Il semble donc qu'en condition de stress chronique, la DMH serait suractivée et induirait la stimulation de la RVL pour induire l'hyperactivation sympathique.

De la même façon, à D10 et D30, le blocage des récepteurs 5-HT<sub>3</sub> par le granisetron, s'il ne prévient pas l'hyperactivité sympathique, restaure la fonctionnalité cardio-vagale du baroréflexe. De plus, les souris « susceptibles » à la défaite sociale ont été caractérisées par une augmentation de l'expression des récepteurs 5-HT<sub>3</sub> dans le NTS. Ainsi, le circuit impliqué dans la réduction du tonus parasympathique semble être le même qu'en condition de stress aigu (Figure 41). Le DMH agit indirectement sur le NTS via la dIPAG, le CnF et le

raphé magnus (Netzer et al. 2011). Ce dernier contient des neurones sérotoninergiques projetant vers le NTS. Les études antérieures réalisées au laboratoire ont montré qu'au niveau du noyau du tractus solitaire (NTS), la sérotonine ainsi libérée stimule les récepteurs 5-HT<sub>3</sub> du NTS, situés sur les afférences vagales. La sérotonine provoque une inhibition GABAergique de la composante cardio-vagale (parasympathique) du baroréflexe (Merahi et al. 1992; Sévoz-Couche et al. 1998 ; Comet et al. 2005; Netzer et al. 2011).



**Figure 41: Rôle du DMH et des récepteurs 5-HT<sub>3</sub> dans l'inhibition de la bradycardie du baroréflexe en condition de stress aigu**

De plus, l'activation des récepteurs 5-HT<sub>3</sub> du NTS provoque une augmentation de la PA par une action directe sur les cellules sympathoexcitatrices de la RVL (Sévoz-Couche 1997 et 1997). On pourrait penser que celle-ci puisse être à l'origine de la réponse pressive induite par la stimulation du DMH en condition de stress aigu ou chronique. Mais cela ne semble pas être le cas car le granisetron ne bloque aucun de ces deux effets presseurs, il s'agit donc de circuits différents.

Au niveau respiratoire aussi, il apparaît que la RVL est impliquée dans les réponses induites par la stimulation du DMH (Barna et al. 2014). Cependant, cette réponse en condition de stress aigu est une hyperventilation (Hilton 1982), et ce circuit ne semble pas être impliqué ici puisque, même si des épisodes de tachypnées mêlées à des apnées ont été observées pendant

les phases de soumission lors du stress social (data non montrées), il apparait que c'est bien une bradypnée chronique qui est observée à distance du stress. **Nous avons pu montrer que le stress social induisait en fait une activation des récepteurs 5-HT<sub>3</sub> du NTS pour induire cette bradypnée.** Ceci suggère qu'il y aurait un circuit commun qui induit non seulement une réduction du tonus parasympathique mais aussi la bradypnée, et qui fait intervenir les récepteurs 5-HT<sub>3</sub> du NTS. D'autre part, le blocage de la bradypnée ne coïncide pas avec le blocage de l'hyperactivité sympathique puisque les paramètres sympathiques de la VFC ne semblent pas être modifiés par le granisetron (ceci va donc à l'encontre du fait que la bradypnée puisse induire l'hyperactivité sympathique). Cependant il est à noter que la stimulation aigue des récepteurs 5-HT<sub>3</sub> du NTS n'induit pas par elle-même de modifications de la fréquence respiratoire.

Une explication dans l'origine de cette bradypnée par les récepteurs 5-HT<sub>3</sub> du NTS peut résider dans une étude récente, qui montre qu'une stimulation faible du DMH induit toujours une hyperactivation sympathique, mais ne provoque plus de modification respiratoire tout en induisant dans le même temps le blocage de la réponse hyperventilatoire du chémoréflexe carotidien (data non montrées). On peut donc supposer que lors du stress social, la réponse hyperventilatoire du chémoréflexe carotidien puisse être bloquée. En ligne avec cette hypothèse, la mise en silence du chémoréflexe périphérique induit une baisse de la fréquence cardiaque basale (Hayward 2001; Tafil-Klawe et al. 1991; Roux et al. 2000; Otake et al. 1992). Or, l'activation des récepteurs 5-HT<sub>3</sub> du NTS bloque la composante vagale du chémoréflexe (Sévoz et al. 1997), et on peut donc supposer qu'elle bloque aussi la composante ventilatoire de ce réflexe (un schéma récapitulatif, faisant aussi intervenir les récepteurs AT<sub>1</sub>, est proposé Figure 42).

## **E) Rôle de l'angiotensine II**

### **Le BDNF sanguin**

Une étude du précédent laboratoire dans lequel j'ai travaillé a montré que suite à ce protocole de défaite sociale induit sur 4 jours, tous les rats stressés présentaient un taux de BDNF

diminué dans le sérum (Blugeot et al. 2011). Ce taux bas a largement été décrit dans des modèles chroniques de stress et dans les pathologies dépressives (Zhao, Zhang, et Pan 2015 ; Hayley et al. 2015). Or la persistance d'un taux bas du BDNF est en fait un marqueur de vulnérabilité à la dépression (Blugeot et al. 2011). Nous avons donc étudié le niveau de BDNF circulant dans nos populations D<sub>A</sub> et D<sub>B</sub>. **Nous avons pu montrer que ce taux restait bas chez les animaux D<sub>A</sub> seulement.** Nous avons donc pu montrer l'existence d'une population d'animaux vulnérables à la dépression, qui présentaient des altérations cardiovasculaires et respiratoires persistantes. Le fait que ce modèle, n'induisant en soit pas de symptômes dépressifs mais anxieux, met en évidence une population tout de même vulnérable à la dépression, peut expliquer que nous retrouvions une modification respiratoire (bradypnée) plus proche des pathologies dépressives que celle des pathologies anxieuses.

### **Le BDNF au niveau de la RVL**

De nombreuses études ont rapporté l'implication d'un stress oxydant au niveau central dans l'hypertension (Zimmerman and Davisson 2004; Peterson et al. 2006). En effet, le stress oxydant dans la RVL par accumulation de l'anion superoxyde joue un rôle important dans le mécanisme neuronal de l'hypertension en augmentant l'activité vasopressive du système nerveux sympathique (Zimmerman and Davisson 2004; Peterson et al. 2006; Nagae et al. 2009; Chan et al. 2005; Chan et al. 2006). La lignée de rat SHR (modèle d'hypertension chronique) présente un stress oxydant au niveau de la RVL dû à un phénotype déficitaire dans la production et l'activité de la superoxyde dismutase (enzyme antioxydante) ( Chan et al. 2006). En effet, le BDNF, connu pour ses actions neurotrophique, agit aussi en s'opposant à l'accumulation de molécules oxydantes telles que l'anion superoxide ou la NADPH dismutase (Boyadjieva and Sarkar 2013). Nous avons donc évalué chez nos rats stressés si une telle modification dans l'expression du BDNF pouvait survenir, ce qui pourrait être un lien avec la survenue de l'hyperactivité sympathique. **Cette hypothèse a été vérifiée puisque nos résultats montrent une augmentation du taux de protéine du BDNF dans la RVL chez les rats ayant subi le stress social, mais uniquement chez les rats présentant des altérations cardiovasculaires persistantes (D<sub>A</sub>).**

*Lien avec l'angiotensine II.* Comme nous l'avons vu dans l'introduction (Chapitre I, I)A)2)), l'angiotensine joue un rôle important dans la régulation de la PA. Il a été démontré

dans plusieurs modèles animaux d'hypertension, que le système rénine-angiotensine central était suractivé (Senanayake et al. 1994; Campbell et al. 1995; Teruya et al. 1995).

La microinjection d'angiotensine II dans la RVL (Allen et al. 1988; Andreatta et al. 1988; Averill et al. 1987; Jensen et al. 1992; Simpson 1981; Severs and Daniels-Severs 1973) augmente la PA. L'angiotensine II agirait sur les neurones sympatho-excitateurs de la RVL par l'intermédiaire des récepteurs AT<sub>1</sub>. Ces observations ont été confirmées par des études *in vitro* qui ont montré que l'angiotensine II évoque une dépolarisation des neurones sympatho-excitateurs, due à une diminution de la conductance potassique (Li and Guyenet 1996) et passant par les récepteurs AT<sub>1</sub> (Sumners et al. 1996). D'autre part, la microinjection de losartan (antagoniste des récepteurs AT<sub>1</sub>) dans la RVL chez des rats SHR réduit l'activité sympathique et la PA moyenne (DiBona and Jones 2001; Tagawa and Dampney 1999). De plus, l'expression des récepteurs AT<sub>1</sub> centraux est influencée par divers facteurs tels que le stress ou la déshydratation et une surexpression est retrouvée chez les rats SHR et dans des modèles expérimentaux d'hypertension (Chen et al. 2014; Barth and Gerstberger 1999; Saavedra et al. 1986; de Oliveira-Sales et al. 2010).

Chan et al en 2010 ont mis en évidence les mécanismes au sein de la RVL expliquant l'accumulation du stress oxydant et son rôle dans l'hypertension, et ont découvert le rôle clé de l'angiotensine II (Chan et al. 2010). Ceci n'est pas surprenant puisque l'action principale de l'angiotensine II via les récepteurs AT<sub>1</sub> au niveau intracellulaire est sur les voies de signalisation induisant un stress oxydant (Bekay et al. 2003). Dans le même contexte, le BDNF est augmenté dans la RVL dans un modèle expérimentale d'hypertension induit par l'accumulation d'angiotensine II (Chan et al. 2010), pour s'opposer au stress oxydant. Inversement, l'augmentation de BDNF lui-même dans le PVN induit une hyperactivité sympathique par l'activation des neurones contenant l'angiotensine II (Erdos et al. 2015). Il y a donc un lien évident entre BDNF augmenté et implication de l'angiotensine II.

**Au vu du rôle de l'angiotensine II sur le plan cardiovasculaire et de nos données montrant une hyperactivité sympathique et une augmentation de BDNF dans la RVL, nous avons émis l'hypothèse que lors du stress social, l'angiotensine II peut être impliquée pour expliquer l'hyperactivité sympathique.** En effet le DMH a des connections glutamatergiques directes avec le PVN, structure contenant des neurones synthétisant l'angiotensine II (Womack and Barrett-Jolley 2007). Des connexions directes existent entre le PVN et la RVL (Yang and Coote 1998).

Tout d'abord nous avons confirmé le fait que la microinjection dans la RVL d'un antagoniste des récepteurs AT<sub>1</sub>, le losartan, était capable de bloquer l'hyperactivité sympathique induite par la stimulation du DMH. Nous avons aussi traité chroniquement les rats avec le losartan dès la fin de la procédure de stress. **Les résultats obtenus à la suite de ce traitement, malgré un nombre de rat encore trop faible, permettent d'observer une tendance à prévenir l'hypertension et l'hyperactivité sympathique induite par le stress chronique chez les rats stressés, et aucune différenciation entre rats D<sub>A</sub> et D<sub>B</sub> ne peut plus avoir lieu.** On peut penser que le BDNF est donc surexprimé en permanence chez les rats D<sub>A</sub>, du fait de la libération continue d'angiotensine II.

### **Le BDNF au niveau du NTS**

Un stress oxydant dans le NTS a été décrit expliquant le déficit vagal dans le transfert d'information vers le noyau ambigu (NA) (Tsai et al. 2013). De plus, un modèle d'hypertension induit le blocage du baroréflexe vagal par la présence d'un stress oxydant au niveau du NTS (Wong et al. 2002). Enfin, l'augmentation de BDNF endogène dans le NTS inhibe les neurones du deuxième ordre du baroréflexe cardiaque (Clark et al. 2011). Au vu de ces informations, la présence d'un stress oxydant dans le NTS peut expliquer la réduction du baroréflexe cardiaque et la bradypnée observées dans nos études. **Nos résultats vont dans ce sens puisque nous observons une augmentation du BDNF dans le NTS chez les rats D<sub>A</sub> qui commence à D10 mais n'est pas significatif, et qui le devient à D30. Cette augmentation est également constatée chez les souris D<sub>S</sub>.**

*Lien avec l'angiotensine II.* L'angiotensine II inhibe la composante cardio-vagale du baroréflexe (Arnold et al. 2010; Polson et al. 2007; Tan et al. 2007; Matsumura et al. 1998) (Luoh 1998, 2009), et son action se localise au niveau du NTS (Michelini and Bonagamba 1990; Casto and Phillips 1986; Paton and Kasparov 1999). De plus, dans un modèle animal d'hypertension induite par l'administration chronique d'angiotensine II, les rats présentent une altération du baroréflexe cardio-vagal à la suite d'une perturbation de la connectivité des neurones du NTS vers les neurones prémoteurs parasympathiques du NA (Tsai et al. 2013). Cette altération du baroréflexe est inhibée par le blocage des récepteurs AT<sub>1</sub> du NTS (Wang et al. 2007). Il se pourrait donc que, comme pour la RVL, l'angiotensine II à l'origine d'un stress oxydant (et donc d'une augmentation du BDNF) induise le blocage du baroréflexe cardiaque via son action sur les récepteurs AT<sub>1</sub>. Nous avons testé cette hypothèse en vérifiant l'effet du traitement chronique au losartan sur les rats stressés. **Nous avons pu observer que le losartan a aussi réversé le blocage du baroréflexe parasympathique apparu après le**

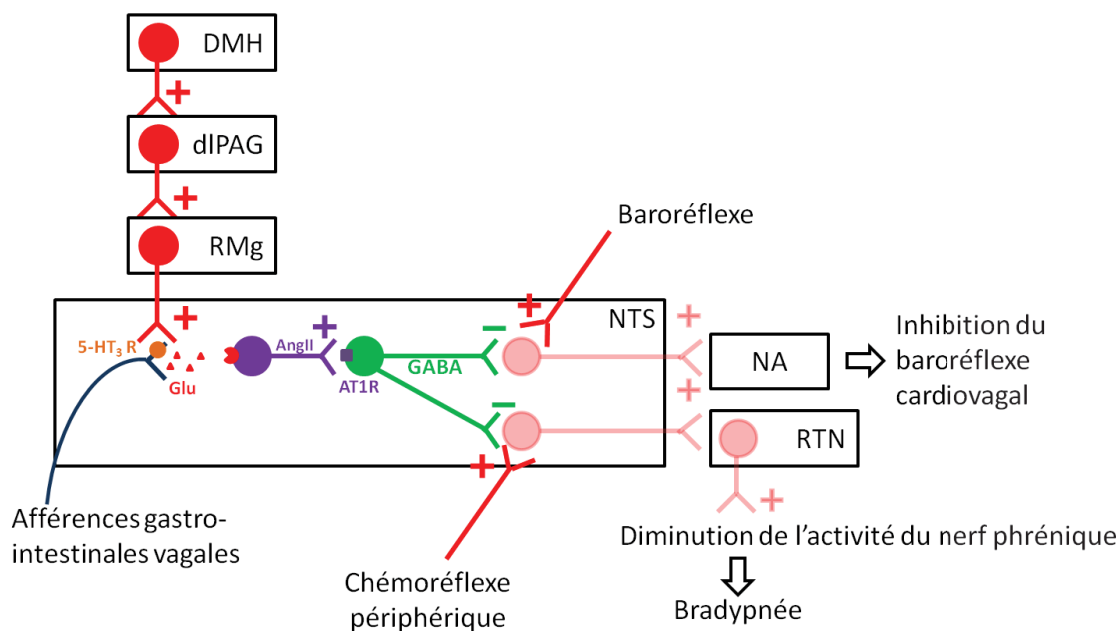


**stress social chez tous les rats stressés, et aucune dissociation entre rats D<sub>A</sub> et D<sub>B</sub> ne pouvait avoir lieu.**

Nous avons déjà évoqué le circuit commun qui semble exister au niveau du NTS pour expliquer la réduction du baroréflexe vagal et la bradypnée par les récepteurs 5-HT<sub>3</sub> locaux. Comme ces modifications font aussi apparaître le rôle des récepteurs AT<sub>1</sub> dans cette structure, il doit y avoir un lien entre les récepteurs AT<sub>1</sub> et 5-HT<sub>3</sub> du NTS pour expliquer l'apparition de ces altérations cardiorespiratoires. Une étude supporte cette hypothèse. En effet, au niveau de l'aire septale, la stimulation des récepteurs 5-HT<sub>3</sub> semble agir sur un système angiotensinergique locale pour activer des interneurons GABA portant des récepteurs AT<sub>1</sub>, et ainsi induire l'inactivation des neurones en lien avec les neurones pré moteurs parasympathiques du noyau ambigu et réduire la réponse cardiaque du baroréflexe (et aussi celle du chémoréflexe carotidien) (Urzedo-Rodrigues et al. 2011). Nous pouvons penser que le même circuit est impliqué au niveau du NTS pour inhiber la réponse vagale du baroréflexe après le stress social (Figure 42). En effet, si des connexions directes existent entre le PVN et le NTS pouvant expliquer la libération de l'angiotensine II dans le NTS lors du stress social (Affleck, Coote, and Pyner 2012), il est à noter que le NTS contient aussi un système angiotensinergique local (Urzedo-Rodrigues et al. 2011; Cheng et al. 2012).

Enfin, il se pourrait que le même circuit puisse aussi expliquer la bradypnée induite par le stress, car l'angiotensine II i) induit une baisse d'activité du nerf phrénique et le blocage de la réponse cardio-vagale du chémoréflexe carotidien (Paton and Kasparov 1999) et ii) le losartan reverse la diminution du pic ASR lors de notre étude. L'ensemble de ces résultats, avec ceux obtenus précédemment (Sévoz-Couche et al. 2003), suggèrent que les interneurons GABA, à la suite de l'activation des récepteurs 5-HT<sub>3</sub> puis AT<sub>1</sub>, pourraient aussi inhiber les neurones impliqués dans l'hyperventilation du chémoréflexe carotidien et produire ainsi une hypoventilation à long terme (Figure 42).





**Figure 42:** Schéma hypothétique des mécanismes impliqués à la fois dans l'inhibition du baroréflexe et dans la bradypnée induite par l'activation du DMH

## II) Perspectives

### A) Angiotensine et BDNF

Le rôle de l'angiotensine II et des récepteurs AT<sub>1</sub> est clairement suggéré par nos résultats. Cependant le faible effectif de ces expériences implique la prudence sur ces résultats, et il faudra attendre des expériences complémentaires en vue d'augmenter le nombre d'animaux ayant reçu le losartan. De plus, l'administration par une pompe osmotique de solution saline ne modifie pas les paramètres cardiorespiratoires des rats stressés chez les animaux anesthésiés à D10 puisqu'ils restent altérés par rapport aux rats contrôles (résultats obtenus dans l'article 1 en contrôle du traitement anxiolytique). Cependant nous n'avons pas encore procédé à l'analyse quotidienne des paramètres cardiorespiratoires sur des animaux ayant reçu une telle infusion et ce jusqu'à D19, et nous devons faire ces expériences pour les comparer à l'effet quotidien du losartan. De plus, il est clair que l'implication de cette substance est à établir par des microinjections locales de losartan dans la RVL et le NTS, en condition de stress chronique.

Des expériences complémentaires immuno-histologiques devront être effectuées en vue de déterminer si les récepteurs AT<sub>1</sub> sont surexprimés dans la RVL comme dans les études utilisant divers modèles d'hypertension, mais aussi dans le NTS (Lazartigues et al. 2002; Chan et al. 2010; Chan et al. 2002; Nunes and Braga 2011). Dans le NTS, notre hypothèse suggère que les récepteurs AT<sub>1</sub> sont localisés sur les interneurons GABA et le marquage de ces récepteurs sur des neurones GABAergiques est nécessaire pour confirmer cette hypothèse. Enfin, il est clair qu'une démonstration évidente de la présence de stress oxydant dans la RVL et le NTS induite par le stress social doit être faite ; en particulier, la présence d'eNOS, de l'anion superoxyde ou de la NADPH oxydase phosphorylée sera recherchée. De plus, la présence de molécules antioxydantes telle que la superoxyde dysmutase (SOD) sera aussi analysée. Enfin, des traitements antioxydants (tempol, vitamine C, ...), qui sont efficaces pour diminuer l'hyperactivité sympathique induite par des modifications endogènes dans la RVL (Wu, Chan, and Chan 2012), et des traitements anti-BDNF (anti-sens oligonucléotide (ASON-BDNF)), qui augmentent l'hypertension dans divers modèles utilisés (Chan et al. 2010), devront aussi être testés pour vérifier l'implication du stress oxydant et du BDNF dans les altérations cardiorespiratoires induites par le stress social.

### **B) Réponses respiratoires du chémoréflexe périphérique et du baroréflexe après un stress social**

Le baroréflexe et le chémoréflexe périphérique ont de fortes interactions réciproques et ensemble, ils contribuent à une circulation adéquate, à une oxygénation des organes et au maintien de l'homéostasie via le contrôle du système nerveux autonome. Les pathologies respiratoires telles que les apnées obstructives du sommeil (OSAS) induisent des hypoxies intermittentes répétées et cela engendre une diminution à long terme de la sensibilité du chémoréflexe périphérique (Osanai et al. 1999), expliquant l'hypoventilation constatée chez ces patients (Weitzenblum et al. 1999). De plus, l'OSAS est souvent lié à une hypertension (Parati et al. 2014), due à un dysfonctionnement de la composante cardio-vagale du baroréflexe (Dyavanapalli et al. 2014). Ces altérations cardiovasculaires observées chez les patients atteints d'OSAS sont associées à la présence d'un stress oxydant et à une hyperactivation du système rénine-angiotensine (Torre-Bouscoulet et al. 2008). Ces données confortent donc notre hypothèse sur une désensibilisation du chémoréflexe périphérique

pouvant expliquer une hypoventilation basale, et sur une association avec l'inhibition du baroréflexe vagal et le stress oxydant.

Il serait donc intéressant d'évaluer la fonctionnalité du chémoréflexe périphérique (cardiovasculaire et respiratoire) dans notre modèle. Pour cela, nous envisageons de mesurer ces paramètres i) en réponse à une stimulation aiguë du chémoréflexe carotidien chez les rats ayant subi le stress social puis anesthésiés, grâce à un pneumotachographe relié à un sac de Douglas (renfermant un air contenant une concentration faible en oxygène, « hypoxie gazeuse ») ou ii) d'exposer les rats vigiles à des challenges hypoxiques en les plaçant dans des chambres pléthysmographiques. Cela sera réalisé à D10 et D30. Ces procédures seront aussi répétées en condition d'hypercapnie (chémoréflexe central). Egalement, la teneur basale en gaz du sang sera dosée afin d'observer si des modifications en CO<sub>2</sub> et O<sub>2</sub> sanguin sont présentes chez les rats D<sub>L</sub>. Si nos résultats confortent nos données, nous travaillerons sur des souris KO pour les récepteurs 5-HT<sub>3</sub>, et nous déterminerons si la réduction i) du tonus vagal en général, et ii) de la composante vagale et respiratoire du chémoréflexe périphérique en particulier, peut disparaître.

## **C) L'hypothèse du rôle central de l'orexine**

### **1) Système orexinergique**

Les neurones synthétisant l'orexine sont situés dans une zone très restreinte du cerveau, à savoir l'hypothalamus et plus précisément la région périfornicale (PeF), le DMH et l'hypothalamus latéral. Il existe deux isoformes, l'orexine A et B (appelé aussi hypocréatine 1 et 2), résultant d'un précurseur, la prépro-orexine. Le système orexinergique affecte le système autonome, neuroendocrine et d'éveil-sommeil (Chemelli et al. 1999; Date et al. 2000; España et al. 2001; Hagan et al. 1999). L'orexine est un neurotransmetteur excitateur et agit via deux récepteurs, OX1 et OX2, récepteurs RCPG (couplé à une protéine G) (Sakurai et al. 1998). Les neurones orexinergiques projettent sur les structures pontiques impliquées dans le contrôle cardiovasculaire et respiratoire.

### **2) Rôle dans le contrôle cardiovasculaire**

Dans le système nerveux central, les neurones synthétisant l'orexine innervent de nombreuses structures et notamment vers des groupes cellulaires impliqués dans la régulation autonome et cardiovasculaire, à savoir la RVL, le raphé pallidus, la dPAG, et le NTS (Chen et al. 2000; Hagan et al. 1999; Kayaba et al. 2003; Sunter et al. 2001; Takahashi et al.

1999; Dampney et al. 2005; McDowall et al. 2006). De plus, des microinjections intracisternales d'orexine A ou B provoque une augmentation dose dépendante de la fréquence cardiaque et de l'activité sympathique (Shirasaka et al. 1999; Kiyoshi Matsumura, Tsuchihashi, and Abe 2001). Cet effet de l'orexine passe par une action sur les neurones sympatho-exciteurs des neurones de la RVL (Antunes et al. 2001; Chen et al. 2000). En effet, des microinjections locales d'orexine au niveau de la RVL provoquent une dépolarisation des neurones présents dans cette structure (Machado et al. 2002; Huang et al. 2010; Shahid et al. 2012).

Ainsi, toutes ces données combinées à la littérature actuelle suggèrent que l'orexine pourrait être impliqué dans la régulation de la PA via une action sympathoexcitatrice vers la RVL.

Son implication dans l'hypertension induit par un stress est de plus en plus étudiée et serait majeure (Clifford et al. 2015; Johnson et al. 2012; Xiao et al. 2013). C'est une piste à explorer par la suite dans notre modèle. Nous envisageons donc de réaliser des microinjections locales dans la RVL chez les rats stressés sous anesthésie à D10 et D30 avec un antagoniste orexinergique. Un traitement chronique semblable au traitement effectué avec le losartan pourra également être réalisé afin d'observer les effets au niveau cardiorespiratoires sur les animaux vigiles. Enfin, l'utilisation de souris KO pour les récepteurs OX1 et OX2 serait intéressante dans notre modèle de défaite sociale pour voir l'effet sur l'hyperactivité sympathique.

## **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

- Affleck V. S., Coote J. H., and Pyner S. 2012. "The Projection and Synaptic Organisation of NTS Afferent Connections with Presympathetic Neurons, GABA and nNOS Neurons in the Paraventricular Nucleus of the Hypothalamus." *Neuroscience* 219 (September): 48–61.
- Agarwal S. K., and Calaresu F. R. 1991. "Monosynaptic Connection from Caudal to Rostral Ventrolateral Medulla in the Baroreceptor Reflex Pathway." *Brain Research* 555 (1): 70–74.
- Agarwal M. K. 1994. "Perspectives in Receptor-Mediated Mineralocorticoid Hormone Action." *Pharmacological Reviews* 46 (1): 67–87.
- Agelink M. W., Majewski T. B., Andrich J. and Mueck-Weymann M.. 2002. "Short-Term Effects of Intravenous Benzodiazepines on Autonomic Neurocardiac Regulation in Humans: A Comparison between Midazolam, Diazepam, and Lorazepam." *Critical Care Medicine* 30 (5): 997–1006.
- Ahern D. K., Gorkin L., Anderson J. L., Tierney C., Hallstrom A., Ewart C., Capone R. J., Schron E., Kornfeld D. and Herd J. A. 1990. "Biobehavioral Variables and Mortality or Cardiac Arrest in the Cardiac Arrhythmia Pilot Study (CAPS)." *The American Journal of Cardiology* 66 (1): 59–62.
- Aicher S. A., Kurucz O. S., Reis D. J., and Milner T. A. 1995. "Nucleus Tractus Solitarius Efferent Terminals Synapse on Neurons in the Caudal Ventrolateral Medulla That Project to the Rostral Ventrolateral Medulla." *Brain Research* 693 (1–2): 51–63.
- Allen A. M., Dampney R. A., and Mendelsohn F. A. 1988. "Angiotensin Receptor Binding and Pressor Effects in Cat Subretrofacial Nucleus." *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 255 (5): H1011–17.
- Allen A. M., McKinley M. J., Oldfield B. J., Dampney R. A., and Mendelsohn F. A. 1988. "Angiotensin II Receptor Binding and the Baroreflex Pathway." *Clinical and Experimental Hypertension. Part A, Theory and Practice* 10 Suppl 1: 63–78.
- Allen A. M., Zhuo J., and Mendelsohn F. A. 2000. "Localization and Function of Angiotensin AT1 Receptors." *American Journal of Hypertension* 13 (1 Pt 2): 31S – 38S.
- Alonso J., Angermeyer M. C., Bernert S., Bruffaerts R., Brugha T. S., Bryson H., de Girolamo G., et al., ESEMeD/MHEDEA 2000 Investigators, European Study of the Epidemiology of Mental Disorders (ESEMeD) Project. 2004. "Prevalence of Mental Disorders in Europe: Results from the European Study of the Epidemiology of Mental Disorders (ESEMeD) Project." *Acta Psychiatrica Scandinavica. Supplementum*, no. 420: 21–27.
- American Psychiatric Association. 2000. Diagnostic and statistical manual of mental disorders, fourth edition, text revision. Washington, DC: American Psychiatric Association
- Anda R., Williamson D., Jones D., Macera C., Eaker E., Glassman A., and Marks J. 1993. "Depressed Affect, Hopelessness, and the Risk of Ischemic Heart Disease in a Cohort of U.S. Adults." *Epidemiology (Cambridge, Mass.)* 4 (4): 285–94.
- Anderson D. E. 1998. "Cardiorenal Effects of Behavioral Inhibition of Breathing." *Biological*

Psychology 49 (1-2): 151–63.

Anderson D. E., and Chesney M. A. 2002. “Gender-Specific Association of Perceived Stress and Inhibited Breathing Pattern.” *International Journal of Behavioral Medicine* 9 (3): 216–27.

Andreatta S. H., Averill D. B., Santos R. A., and Ferrario C. M.. 1988. “The Ventrolateral Medulla. A New Site of Action of the Renin-Angiotensin System.” *Hypertension* 11 (2 Pt 2): I163–66.

Andre J., Zeau B., Pohl M., Cesselin F., Benoliel J.-J., and Becker C. 2005. “Involvement of Cholecystokinergic Systems in Anxiety-Induced Hyperalgesia in Male Rats: Behavioral and Biochemical Studies.” *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 25 (35): 7896–7904.

Antunes V. R., Cristina Brailoiu G., Kwok E. H., Scruggs P., and Dun N. J.. 2001. “Orexins/hypocretins Excite Rat Sympathetic Preganglionic Neurons in Vivo and in Vitro.” *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 281 (6): R1801–7.

Arnold A. C., Isa K., Shaltout H. A., Nautiyal M., Ferrario C. M., Chappell M. C., and Diz D. I. 2010. “Angiotensin-(1–12) Requires Angiotensin Converting Enzyme and AT1 Receptors for Cardiovascular Actions within the Solitary Tract Nucleus.” *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 299 (3): H763–71.

Arthur J. M., Bonham A. C., Gutterman D. D., Gebhart G. F., Marcus M. L., and Brody M. J. 1991. “Coronary Vasoconstriction during Stimulation in Hypothalamic Defense Region.” *The American Journal of Physiology* 260 (2 Pt 2): R335–45.

Asano Y. 1986. “Characteristics of Open Field Behavior of Wistar and Sprague-Dawley Rats.” *Jikken Dobutsu. Experimental Animals* 35 (4): 505–8.

Ashworth-Preece M. A., Jarrott B., and Lawrence A. J. 1995. “5-Hydroxytryptamine<sub>3</sub> Receptor Modulation of Excitatory Amino Acid Release in the Rat Nucleus Tractus Solitarius.” *Neuroscience Letters* 191 (1-2): 75–78.

Aubert, A. E., Seps B., and Beckers F. 2003. “Heart Rate Variability in Athletes.” *Sports Medicine (Auckland, N.Z.)* 33 (12): 889–919.

Averill, D. B., Diz D. I., Barnes K. L., and Ferrario C. M. 1987. “Pressor Responses of Angiotensin II Microinjected into the Dorsomedial Medulla of the Dog.” *Brain Research* 414 (2): 294–300.

Averill J.R. 1969. “Autonomic Response Patterns During Sadness and Mirth.” *Psychophysiology* 5 (4): 399–414.

Azman K. F., Zakaria R., AbdAziz C., Othman Z., and Al-Rahbi B. 2015. “Tualang Honey Improves Memory Performance and Decreases Depressive-like Behavior in Rats Exposed to Loud Noise Stress.” *Noise & Health* 17 (75): 83–89.

Bader M and Ganten D. 2002. “It’s Renin in the Brain Transgenic Animals Elucidate the Brain Renin-Angiotensin System.” *Circulation Research* 90 (1): 8–10.

Bajkó Z., Szekeres C.-C., Kovács K. R., Csapó K., Molnár S., Soltész P., Nyitrai E., et al. 2012. “Anxiety, Depression and Autonomic Nervous System Dysfunction in Hypertension.”

*Journal of the Neurological Sciences* 317 (1-2): 112–16.

Balogh S., Fitzpatrick D. F., Hendricks S. E. and Paige S. R. 1993. “Increases in Heart Rate Variability with Successful Treatment in Patients with Major Depressive Disorder.” *Psychopharmacology Bulletin* 29 (2): 201–6.

Bamberger C. M., Schulte H. M. and Chrousos G. P. 1996. “Molecular Determinants of Glucocorticoid Receptor Function and Tissue Sensitivity to Glucocorticoids.” *Endocrine Reviews* 17 (3): 245–61.

Bard P. 1928. A diencephalic mechanism for the expression of rage with special reference to the sympathetic nervous system. *Am.J.Physiol.* 84:490–515.

Barefoot J. C., Helms M. J., Mark D. B., Blumenthal J. A., Califf R. M., Haney T. L., O'Connor C. M., Siegler I. C. and Williams R. B. 1996. “Depression and Long-Term Mortality Risk in Patients With Coronary Artery Disease.” *The American Journal of Cardiology* 78 (6): 613–17.

Bär K.-J., Greiner W., Jochum T., Friedrich M., Wagner G. and Sauer H. 2004. “The Influence of Major Depression and Its Treatment on Heart Rate Variability and Pupillary Light Reflex Parameters.” *Journal of Affective Disorders* 82 (2): 245–52. doi:10.1016/j.jad.2003.12.016.

Barna B. F., Takakura A. C., and Moreira T. S.. 2014. “Acute Exercise-Induced Activation of Phox2b-Expressing Neurons of the Retrotrapezoid Nucleus in Rats May Involve the Hypothalamus.” *Neuroscience* 258 (January): 355–63.

Barnes K. L., Diz D. I., and Ferrario C. M. 1991. “Functional Interactions between Angiotensin II and Substance P in the Dorsal Medulla.” *Hypertension* 17 (6 Pt 2): 1121–26.

Barth S. W. and Gerstberger R. 1999. “Differential Regulation of Angiotensinogen and AT1A Receptor mRNA within the Rat Subfornical Organ during Dehydration.” *Molecular Brain Research* 64 (2): 151–64.

Barzegar M., Sajjadi F. S., Talaei S. A., Hamidi G. and Salami M.. 2015. “Prenatal Exposure to Noise Stress: Anxiety, Impaired Spatial Memory, and Deteriorated Hippocampal Plasticity in Postnatal Life.” *Hippocampus* 25 (2): 187–96.

Becker C., Thièbot M. H., Tuitou Y., Hamon M., Cesselin F. and Benoliel J. J. 2001. “Enhanced Cortical Extracellular Levels of Cholecystinin-like Material in a Model of Anticipation of Social Defeat in the Rat.” *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 21 (1): 262–69.

Becker C., Zeau B., Rivat C., Blugeot A., Hamon M., and Benoliel J.-J. 2008. “Repeated Social Defeat-Induced Depression-like Behavioral and Biological Alterations in Rats: Involvement of Cholecystinin.” *Molecular Psychiatry* 13 (12): 1079–92.

Beig M. I., Baumert M., Walker F. R., Day T. A., and Nalivaiko E. 2009. “Blockade of 5-HT<sub>2A</sub> Receptors Suppresses Hyperthermic but Not Cardiovascular Responses to Psychosocial Stress in Rats.” *Neuroscience* 159 (3): 1185–91.

Bekay R. E., Álvarez M., Monteseirín J., Alba G., Chacón P., Vega A., Martín-Nieto J., et al. 2003. “Oxidative Stress Is a Critical Mediator of the Angiotensin II Signal in Human Neutrophils: Involvement of Mitogen-Activated Protein Kinase, Calcineurin, and the



Transcription Factor NF- $\kappa$ B.” *Blood* 102 (2): 662–71.

Belhadj K. E. and Petermann F. 2015. “[Common Risk Factors of Depressive and Anxiety Symptomatology in Childhood and Adolescence: A Systematic Review from Transdiagnostic Perspectives].” *Fortschritte Der Neurologie-Psychiatrie* 83 (6): 321–33.

Berger S., Kliem A., Yeragani V. and Bär K.-J. 2012. “Cardio-Respiratory Coupling in Untreated Patients with Major Depression.” *Journal of Affective Disorders* 139 (2): 166–71.

Bernardi L., Porta C., Gabutti A., Spicuzza L. and Sleight P. 2001. “Modulatory Effects of Respiration.” *Autonomic Neuroscience: Basic & Clinical* 90 (1-2): 47–56.

Bernard, J.-F., Netzer F., Gau R., Hamon M., Laguzzi R., and C. Sévoz-Couche. 2008. “Critical Role of B3 Serotonergic Cells in Baroreflex Inhibition during the Defense Reaction Triggered by Dorsal Periaqueductal Gray Stimulation.” *The Journal of Comparative Neurology* 506 (1): 108–21.

Bernstein-Goral, H., and Bohn M. C.. 1989. “Phenylethanolamine N-Methyltransferase-Immunoreactive Terminals Synapse on Adrenal Preganglionic Neurons in the Rat Spinal Cord.” *Neuroscience* 32 (2): 521–37.

Bertrand F. and Hugelin A. 1971. “Respiratory Synchronizing Function of Nucleus Parabrachialis Medialis: Pneumotaxic Mechanisms.” *Journal of Neurophysiology* 34 (2): 189–207.

Bianchi, A. L., Grélot L., Iscoe S. and Remmers J. E. 1988. “Electrophysiological Properties of Rostral Medullary Respiratory Neurons in the Cat: An Intracellular Study.” *The Journal of Physiology* 407 (December): 293–310.

Bianchi A. L., Denavit-Saubie M. and Champagnat J. 1995. “Central Control of Breathing in Mammals: Neuronal Circuitry, Membrane Properties, and Neurotransmitters.” *Physiological Reviews* 75 (1): 1–45.

Bigger J. T., Fleiss J. L., Steinman R. C., Rolnitzky L. M., Kleiger R. E., and Rottman J. N. 1992. “Frequency Domain Measures of Heart Period Variability and Mortality after Myocardial Infarction.” *Circulation* 85 (1): 164–71.

Bigger J. T., Fleiss J. L., Rolnitzky L. M., and Steinman R. C.. 1993. “The Ability of Several Short-Term Measures of RR Variability to Predict Mortality after Myocardial Infarction.” *Circulation* 88 (3): 927–34.

Blugeot A., Rivat C., Bouvier E., Molet J., Mouchard A., Zeau B., Bernard C., Benoliel J.-J. and Becker C. 2011. “Vulnerability to Depression: From Brain Neuroplasticity to Identification of Biomarkers.” *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 31 (36): 12889–99.

Bochorishvili Ge., Stornetta R. L., Coates M. B., and Guyenet P. G.. 2012. “Pre-Bötzinger Complex Receives Glutamatergic Innervation from Galaninergic and Other Retrotrapezoid Nucleus Neurons.” *The Journal of Comparative Neurology* 520 (5): 1047–61.

Bodnoff, S. R., Suranyi-Cadotte B., Aitken D. H., Quirion R., and Meaney M. J.. 1988. “The Effects of Chronic Antidepressant Treatment in an Animal Model of Anxiety.” *Psychopharmacology* 95 (3): 298–302.



- Bonagamba L. G., Sévoz-Couche C., N'Diaye A., Uygun-Louvet K., Callera J., Machado B. H., Hamon M. and Laguzzi R. 2000. "Bradycardic Responses to Microinjection of N-Methyl-D-Aspartate into the Nucleus Tractus Solitarius Are Inhibited by Local Activation of 5-HT(3) Receptors." *Neuropharmacology* 39 (12): 2336–45.
- Bondarenko E., Beig M. I., Hodgson D. M., Braga V. A. and Nalivaiko E. 2015. "Blockade of the Dorsomedial Hypothalamus and the Perifornical Area Inhibits Respiratory Responses to Arousing and Stressful Stimuli." *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 308 (10): R816–22.
- Bortolato M., Mangieri R. A., Fu J., Kim J. H., Arguello O., Duranti A., Tontini A., Mor M., Tarzia G. and Piomelli D. 2007. "Antidepressant-like Activity of the Fatty Acid Amide Hydrolase Inhibitor URB597 in a Rat Model of Chronic Mild Stress." *Biological Psychiatry* 62 (10): 1103–10.
- Boudarene M., Timsit-Berthier M. and Legros J.-J. 1997. "[What is stress?]." *Revue Médicale De Liège* 52 (8): 541–49.
- Boufleur N., Antoniazzi C. T. D., Pase C. S., Benvegnú D. M., Dias V. T., Segat H. J., Roversi K., et al. 2013. "Neonatal Handling Prevents Anxiety-like Symptoms in Rats Exposed to Chronic Mild Stress: Behavioral and Oxidative Parameters." *Stress (Amsterdam, Netherlands)* 16 (3): 321–30.
- Boyadjieva N. I. and Sarkar D. K. 2013. "Cyclic Adenosine Monophosphate and Brain-Derived Neurotrophic Factor Decreased Oxidative Stress and Apoptosis in Developing Hypothalamic Neuronal Cells: Role of Microglia." *Alcoholism, Clinical and Experimental Research* 37 (8): 1370–79.
- Boychuk C. R. and Hayward L. F. 2011. "Prenatal Nicotine Exposure Alters Postnatal Cardiorespiratory Integration in Young Male but Not Female Rats." *Experimental Neurology* 232 (2): 212–21.
- Boyle M. P., Kolber B. J., Vogt S. K., Wozniak D. F., and Muglia L. J.. 2006. "Forebrain Glucocorticoid Receptors Modulate Anxiety-Associated Locomotor Activation and Adrenal Responsiveness." *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 26 (7): 1971–78.
- Brenes J. C. and Fornaguera J. 2009. "The Effect of Chronic Fluoxetine on Social Isolation-Induced Changes on Sucrose Consumption, Immobility Behavior, and on Serotonin and Dopamine Function in Hippocampus and Ventral Striatum." *Behavioural Brain Research* 198 (1): 199–205.
- Briski K. and Gillen E. 2001. "Differential Distribution of Fos Expression within the Male Rat Preoptic Area and Hypothalamus in Response to Physical vs. Psychological Stress." *Brain Research Bulletin* 55 (3): 401–8.
- Broadhurst P. L. 1957. "Determinants of Emotionality in the Rat. I. Situational Factors." *British Journal of Psychology (London, England: 1953)* 48 (1): 1–12.
- Broadhurst P. L. 1958. "Determinants of Emotionality in the Rat. II. Antecedent Factors." *British Journal of Psychology (London, England: 1953)* 49 (1): 12–20.
- Brunello N., Mendlewicz J., Kasper S., Leonard B., Montgomery S., Nelson J., Paykel E., Versiani M. and Racagni G. 2002. "The Role of Noradrenaline and Selective Noradrenaline

Reuptake Inhibition in Depression.” *European Neuropsychopharmacology: The Journal of the European College of Neuropsychopharmacology* 12 (5): 461–75.

Bruner C. A. and Vargas I. 1994. “The Activity of Rats in a Swimming Situation as a Function of Water Temperature.” *Physiology & Behavior* 55 (1): 21–28.

Brüning C. A., Martini F., Soares S. M., Sampaio T. B., Gai B. M., Duarte M. M. and Nogueira C. W. 2015. “M-Trifluoromethyl-Diphenyl Diselenide, a Multi-Target Selenium Compound, Prevented Mechanical Allodynia and Depressive-like Behavior in a Mouse Comorbid Pain and Depression Model.” *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* 63 (May): 35–46.

Burkhardt S. C. A., Wilhelm F. H., Meuret A. E., Blechert J., and Roth W. T.. 2010. “Temporal Stability and Coherence of Anxiety, Dyspnea, and Physiological Variables in Panic Disorder.” *Biological Psychology* 85 (2): 226–32.

Caceres C. and Burns J. W.. 1997. “Cardiovascular Reactivity to Psychological Stress May Enhance Subsequent Pain Sensitivity.” *Pain* 69 (3): 237–44.

Cairncross K. D., Cox B., Forster C. and Wren A. F. 1977. “The Olfactory Bulbectomized Rat: A Simple Model for Detecting Drugs with Antidepressant Potential [proceedings].” *British Journal of Pharmacology* 61 (3): 497P.

Cairncross K. D., Cox B., Schnieden H., and Wren A.. 1977. “Modification by Anti-Depressant Drugs of Plasma Corticosterone Levels in the Stressed Bulbectomized Rat [proceedings].” *British Journal of Pharmacology* 61 (1): 144P.

Cairncross K. D., Cox B., Kerwin R., Forster C., and Wren A. F.. 1978. “Behavioural Changes Induced by Olfactory Bulb Ablation and Intrabulbar Injection of 5,6-DHT: Susceptibility to Psychotropic Drugs [proceedings].” *British Journal of Pharmacology* 62 (3): 400P – 401P.

Calil C. M. and Marcondes F. K. 2006. “The Comparison of Immobility Time in Experimental Rat Swimming Models.” *Life Sciences* 79 (18): 1712–19.

Callera J. C., Sévoz-Couche C., Laguzzi R. and Machado B. H. 1997. “Microinjection of a serotonin<sub>3</sub> Receptor Agonist into the NTS of Unanesthetized Rats Inhibits the Bradycardia Evoked by Activation of the Baro- and Chemoreflexes.” *Journal of the Autonomic Nervous System* 63 (3): 127–36.

Campagnole-Santos, M. J., Diz D. I. and Ferrario C. M. 1990. “Actions of Angiotensin Peptides after Partial Denervation of the Solitary Tract Nucleus.” *Hypertension* 15 (2 Suppl): I34.

Campos A. C., Fogaça M. V., Aguiar D. C., and Guimarães F. S. 2013. “Animal Models of Anxiety Disorders and Stress.” *Revista Brasileira De Psiquiatria (São Paulo, Brazil: 1999)* 35 Suppl 2: S101–11.

Carnevali L., Mastorci F., Graiani G., Razzoli M., Trombini M., Pico-Alfonso M. A., Arban R., Grippo A. J., Quaini F. and Sgoifo A. 2012. “Social Defeat and Isolation Induce Clear Signs of a Depression-like State, but Modest Cardiac Alterations in Wild-Type Rats.” *Physiology & Behavior* 106 (2): 142–50.

Carnevali L., Sgoifo A., Trombini M., Landgraf R., Neumann I. D. and Nalivaiko E. 2013.

“Different Patterns of Respiration in Rat Lines Selectively Bred for High or Low Anxiety.” *PloS One* 8 (5): e64519.

Carnevali L., Trombini M., Porta A., Montano N., de Boer S. F. and Sgoifo A. 2013. “Vagal Withdrawal and Susceptibility to Cardiac Arrhythmias in Rats with High Trait Aggressiveness.” *PloS One* 8 (7): e68316.

Carnevali L., Trombini M., Rossi S., Graiani G., Manghi M., Koolhaas J. M., Quaini F., Macchi E., Nalivaiko E., and Sgoifo A. 2013. “Structural and Electrical Myocardial Remodeling in a Rodent Model of Depression.” *Psychosomatic Medicine* 75 (1): 42–51.

Carnevali L., Trombini M., Graiani G., Madeddu D., Quaini F., Landgraf R., Neumann I. D., Nalivaiko E. and Sgoifo A. 2014. “Low Vagally-Mediated Heart Rate Variability and Increased Susceptibility to Ventricular Arrhythmias in Rats Bred for High Anxiety.” *Physiology & Behavior* 128 (April): 16–25.

Carney R. M., Freedland K. E., Stein P. K., Skala J. A., Hoffman P. and Jaffe A. S. 2000. “Change in Heart Rate and Heart Rate Variability during Treatment for Depression in Patients with Coronary Heart Disease.” *Psychosomatic Medicine* 62 (5): 639–47.

Campbell D.J., Duncan A.M., Kladis A. and Harrap S.B. 1995. " Angiotensin peptides in spontaneously hypertensive and normotensive Donryu rats." *Hypertension*. 25(5):928-34.

Carrive P., Dampney R. A. L. and Bandler R.. 1987. “Excitation of Neurones in a Restricted Portion of the Midbrain Periaqueductal Grey Elicits Both Behavioural and Cardiovascular Components of the Defence Reaction in the Unanaesthetised Decerebrate Cat.” *Neuroscience Letters* 81 (3): 273–78.

Carrive P. 2000. “Conditioned Fear to Environmental Context: Cardiovascular and Behavioral Components in the Rat.” *Brain Research* 858 (2): 440–45.

Carsia R. V. and Malamed S. 1983. “Glucocorticoid Control of Steroidogenesis in Isolated Rat Adrenocortical Cells.” *Biochimica Et Biophysica Acta* 763 (1): 83–89.

Casto R. and Phillips M. I. 1986. “Angiotensin II Attenuates Baroreflexes at Nucleus Tractus Solitarius of Rats.” *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 250 (2): R193–98.

Champagne F. A., Francis D. D., Mar A. and Meaney M. J. 2003. “Variations in Maternal Care in the Rat as a Mediating Influence for the Effects of Environment on Development.” *Physiology & Behavior* 79 (3): 359–71.

Chan Chee C., Gourier-Fréry C., Guignard R. and Beck F.. 2011. “[The current state of mental health surveillance in France].” *Santé Publique (Vandoeuvre-Lès-Nancy, France)* 23 Suppl 6 (December): S13–29.

Chang H.-A., Chang C.-C., Tzeng N.-S., Kuo T. B. J., Lu R.-B. and Huang S.-Y. 2013. “Decreased Cardiac Vagal Control in Drug-Naïve Patients with Panic Disorder: A Case-Control Study in Taiwan.” *Asia-Pacific Psychiatry: Official Journal of the Pacific Rim College of Psychiatrists* 5 (2): 80–89.

Chang M-H, Hsu J.-W., Huang K.-L., Su T.-P., Bai Y.-M., Li C.-T., Yang A. C., et al. 2015. “Bidirectional Association between Depression and Fibromyalgia Syndrome: A Nationwide Longitudinal Study.” *The Journal of Pain: Official Journal of the American Pain Society*.

- Chan R. K. and Sawchenko P. E.. 1998. "Organization and Transmitter Specificity of Medullary Neurons Activated by Sustained Hypertension: Implications for Understanding Baroreceptor Reflex Circuitry." *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 18 (1): 371–87.
- Chan, J. Y. H., Wang L.-L., Lee H.-Y. and Chan S. H. H. 2002. "Augmented Upregulation by c-Fos of Angiotensin Subtype 1 Receptor in Nucleus Tractus Solitarii of Spontaneously Hypertensive Rats." *Hypertension* 40 (3): 335–41.
- Chan S. H. H., K.-S. Hsu, Huang Ch.-Ch., Wang L.-L., Ou C.-C., and Chan J. Y. H.. 2005. "NADPH Oxidase-Derived Superoxide Anion Mediates Angiotensin II-Induced Pressor Effect via Activation of p38 Mitogen-Activated Protein Kinase in the Rostral Ventrolateral Medulla." *Circulation Research* 97 (8): 772–80.
- Chan S. H. H., Tai M.-H., Li C.-Y. and Chan J. Y. H. 2006. "Reduction in Molecular Synthesis or Enzyme Activity of Superoxide Dismutases and Catalase Contributes to Oxidative Stress and Neurogenic Hypertension in Spontaneously Hypertensive Rats." *Free Radical Biology and Medicine* 40 (11): 2028–39.
- Chan S. H. H., Wu C.-W. J., Chang A. Y. W., Hsu K.-S. and Chan J. Y. H. 2010a. "Transcriptional Upregulation of Brain-Derived Neurotrophic Factor in Rostral Ventrolateral Medulla by Angiotensin II: Significance in Superoxide Homeostasis and Neural Regulation of Arterial Pressure." *Circulation Research* 107 (9): 1127–39.
- Chemelli R. M., Willie J. T., Sinton C. M., Elmquist J. K., Scammell T., Lee C., Richardson J. A., et al. 1999. "Narcolepsy in Orexin Knockout Mice: Molecular Genetics of Sleep Regulation." *Cell* 98 (4): 437–51.
- Chen C.-T., Hwang L.-L., Chang J.-K., and Dun N. J.. 2000. "Pressor Effects of Orexins Injected Intracisternally and to Rostral Ventrolateral Medulla of Anesthetized Rats." *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 278 (3): R692–97.
- Chen A., Huang B. S., Wang H.-W., Ahmad M. and Leenen F. H. H. 2014. "Knockdown of Mineralocorticoid or Angiotensin II Type 1 Receptor Gene Expression in the Paraventricular Nucleus Prevents Angiotensin II Hypertension in Rats." *The Journal of Physiology* 592 (16): 3523–36.
- Chen S., Sun P., Wang S., Lin G. and Wang T. 2015. "Effects of Heart Rate Variability Biofeedback on Cardiovascular Responses and Autonomic Sympathovagal Modulation Following Stressor Tasks in Prehypertensives." *Journal of Human Hypertension*, April.
- Cheng, W.-H., Lu P.-J., Hsiao M., Hsiao C.-H., Ho W.-Y., Cheng P.-W., Lin C.-T., Hong L.-Z. and Tseng C.-J. 2012. "Renin Activates PI3K-Akt-eNOS Signalling through the Angiotensin AT<sub>1</sub> and Mas Receptors to Modulate Central Blood Pressure Control in the Nucleus Tractus Solitarii." *British Journal of Pharmacology* 166 (7): 2024–35.
- Cheng P., Casement M. D., Chen C.-F., Hoffmann R. F., Armitage R. and Deldin P. J. 2013. "Sleep-Disordered Breathing in Major Depressive Disorder." *Journal of Sleep Research* 22 (4): 459–62.
- Chrousos G. P. and Gold P. W. 1992. "The Concepts of Stress and Stress System Disorders: Overview of Physical and Behavioral Homeostasis." *JAMA* 267 (9): 1244–52.

- Ciriello J. 1983. "Brainstem Projections of Aortic Baroreceptor Afferent Fibers in the Rat." *Neuroscience Letters* 36 (1): 37–42. doi:10.1016/0304-3940(83)90482-2.
- Clark A. S., Mitre M. C. and Brinck-Johnsen T. 1995. "Anabolic-Androgenic Steroid and Adrenal Steroid Effects on Hippocampal Plasticity." *Brain Research* 679 (1): 64–71.
- Clark C. G., Hasser E. M., Kunze D. L., Katz D. M. and Kline D. D. 2011. "Endogenous Brain-Derived Neurotrophic Factor in the Nucleus Tractus Solitarius Tonicly Regulates Synaptic and Autonomic Function." *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 31 (34): 12318–29.
- Clifford L., Dampney B. W. and Carrive P. 2015. "Spontaneously Hypertensive Rats Have More Orexin Neurons in Their Medial Hypothalamus than Normotensive Rats." *Experimental Physiology*, February
- Cohen M. I. and Wang S. C. 1959. "Respiratory Neuronal Activity in Pons of Cat." *Journal of Neurophysiology* 22 (1): 33–50.
- Cohen H. and Benjamin J. 2006. "Power Spectrum Analysis and Cardiovascular Morbidity in Anxiety Disorders." *Autonomic Neuroscience: Basic & Clinical* 128 (1-2): 1–8.
- Cole M.-A., Kim P. J., Kalman B. A. and Spencer R. L. 2000. "Dexamethasone Suppression of Corticosteroid Secretion: Evaluation of the Site of Action by Receptor Measures and Functional Studies." *Psychoneuroendocrinology* 25 (2): 151–67.
- Comet M.-A., Laguzzi R., Hamon M. and Sévoz-Couche C. 2005. "Functional Interaction between Nucleus Tractus Solitarius NK1 and 5-HT3 Receptors in the Inhibition of Baroreflex in Rats." *Cardiovascular Research* 65 (4): 930–39.
- Comet M.-A., Bernard J. F., Hamon M., Laguzzi R. and Sévoz-Couche C. 2007. "Activation of Nucleus Tractus Solitarius 5-HT2A but Not Other 5-HT2 Receptor Subtypes Inhibits the Sympathetic Activity in Rats." *The European Journal of Neuroscience* 26 (2): 345–54.
- Cooney J. M. and Dinan T. G. 2000. "Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis Early-Feedback Responses Are Preserved in Melancholic Depression: A Study of Sertraline Treatment." *Human Psychopharmacology* 15 (5): 351–56.
- Coote J. H., Hilton S. M., and Perez-Gonzalez J. F. 1979. "Inhibition of the Baroreceptor Reflex on Stimulation in the Brain Stem Defence Centre." *The Journal of Physiology* 288 (March): 549–60.
- Coryell W., Noyes R. and House J. D. 1986. "Mortality among Outpatients with Anxiety Disorders." *The American Journal of Psychiatry* 143 (4): 508–10.
- Cravo S. L. and Morrison S. F.. 1993. "The Caudal Ventrolateral Medulla Is a Source of Tonic Sympathoinhibition." *Brain Research* 621 (1): 133–36.
- Crawley J. N. 1981. "Neuropharmacologic Specificity of a Simple Animal Model for the Behavioral Actions of Benzodiazepines." *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior* 15 (5): 695–99.
- Croom K. F., Perry C. M. and Plosker G. L. 2009. "Mirtazapine: A Review of Its Use in Major Depression and Other Psychiatric Disorders." *CNS Drugs* 23 (5): 427–52.



Cryan J. F., Markou A. and Lucki I. 2002. "Assessing Antidepressant Activity in Rodents: Recent Developments and Future Needs." *Trends in Pharmacological Sciences* 23 (5): 238–45.

Cryan J. F., Page M. E. and Lucki I. 2005. "Differential Behavioral Effects of the Antidepressants Reboxetine, Fluoxetine, and Moclobemide in a Modified Forced Swim Test Following Chronic Treatment." *Psychopharmacology* 182 (3): 335–44.

Dallman M. F., Akana S. F., Levin N., Walker C. D., Bradbury M. J. Suemaru S., and Scribner K. S. 1994. "Corticosteroids and the Control of Function in the Hypothalamo-Pituitary-Adrenal (HPA) Axis." *Annals of the New York Academy of Sciences* 746 (November): 22–31; discussion 31–32, 64–67.

Dampney R. A. L., Coleman M. J., Fontes M. A. P., Hirooka Y., Horiuchi J., Li Y. W., Polson J. W., Potts P. D. and Tagawa T. 2002. "Central Mechanisms Underlying Short- and Long-Term Regulation of the Cardiovascular System." *Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology* 29 (4): 261–68.

Dampney R. A. L., Horiuchi J., Killinger S., Sheriff M. J., Tan P. S. P. and McDowall L. M. 2005. "Long-Term Regulation of Arterial Blood Pressure by Hypothalamic Nuclei: Some Critical Questions." *Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology* 32 (5-6): 419–25.

Dando S. B., Skinner M. R., Jordan D. and Ramage A. G. 1998. "Modulation of the Vagal Bradycardia Evoked by Stimulation of Upper Airway Receptors by Central 5-HT<sub>1</sub> Receptors in Anaesthetized Rabbits." *British Journal of Pharmacology* 125 (2): 409–17.

Dantzer R. 1995. "[Stress theories and the somatization process]." *L'Encéphale* 21 Spec No 7 (December): 3–9.

D'Aquila P. S., Brain P. and Willner P. 1994. "Effects of Chronic Mild Stress on Performance in Behavioural Tests Relevant to Anxiety and Depression." *Physiology & Behavior* 56 (5): 861–67.

Date Y., Mondal M. S., Matsukura S. and Nakazato M. 2000. "Distribution of Orexin-A and Orexin-B (hypocretins) in the Rat Spinal Cord." *Neuroscience Letters* 288 (2): 87–90.

Datta, Avijit, and Michael Tipton. 2006. "Respiratory Responses to Cold Water Immersion: Neural Pathways, Interactions, and Clinical Consequences Awake and Asleep." *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)* 100 (6): 2057–64.

David D. J., Klemenhausen K. C., Holick K. A., Saxe M. D., Mendez I., Santarelli L., Craig D. A., et al. 2007. "Efficacy of the MCHR1 Antagonist N-[3-(1-{[4-(3,4-difluorophenoxy)phenyl]methyl}(4-Piperidyl))-4-Methylphenyl]-2-Methylpropanamide (SNAP 94847) in Mouse Models of Anxiety and Depression Following Acute and Chronic Administration Is Independent of Hippocampal Neurogenesis." *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 321 (1): 237–48.

Davies R. O. and Edwards M. W. 1973. "Distribution of Carotid Body Chemoreceptor Afferents in the Medulla of the Cat." *Brain Research* 64 (December): 451–54.

Davies R. O. and Kalia M. 1981. "Carotid Sinus Nerve Projections to the Brain Stem in the

Cat.” *Brain Research Bulletin* 6 (6): 531–41.

Davydov D. M., Shapiro D., Cook I. A. and Goldstein I. 2007. “Baroreflex Mechanisms in Major Depression.” *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* 31 (1): 164–77.

Dawson G. R. and Tricklebank M. D.. 1995. “Use of the Elevated plus Maze in the Search for Novel Anxiolytic Agents.” *Trends in Pharmacological Sciences* 16 (2): 33–36.

De Bruyne M. C., Kors J. A., Hoes A. W., Klootwijk P., Dekker J. M., Hofman A., van Bommel J. H. and Grobbee D. E. 1999. “Both Decreased and Increased Heart Rate Variability on the Standard 10-Second Electrocardiogram Predict Cardiac Mortality in the Elderly: The Rotterdam Study.” *American Journal of Epidemiology* 150 (12): 1282–88.

Dekker J. M., Crow R. S., Folsom A. R., Hannan P. J., Liao D., Swenne C. A. and Schouten E. G. 2000. “Low Heart Rate Variability in a 2-Minute Rhythm Strip Predicts Risk of Coronary Heart Disease and Mortality from Several Causes: The ARIC Study. Atherosclerosis Risk In Communities.” *Circulation* 102 (11): 1239–44.

De Kloet E. R., Vreugdenhil E., Oitzl M. S. and Joëls M. 1998. “Brain Corticosteroid Receptor Balance in Health and Disease.” *Endocrine Reviews* 19 (3): 269–301.

Deng B.-S., Nakamura A., Zhang W., Yanagisawa M., Fukuda Y. and Kuwaki T. 2007. “Contribution of Orexin in Hypercapnic Chemoreflex: Evidence from Genetic and Pharmacological Disruption and Supplementation Studies in Mice.” *Journal of Applied Physiology* 103 (5): 1772–79.

Denver J. W., Reed S. F. and Porges S. W. 2007. “Methodological Issues in the Quantification of Respiratory Sinus Arrhythmia.” *Biological Psychology* 74 (2): 286–94.

De Oliveira-Sales E. B., Nishi E. E., Boim M. A., Dolnikoff M. S., Bergamaschi C. T. and Campos R. R. 2010. “Upregulation of AT1R and iNOS in the Rostral Ventrolateral Medulla (RVLM) Is Essential for the Sympathetic Hyperactivity and Hypertension in the 2K-1C Wistar Rat Model.” *American Journal of Hypertension* 23 (7): 708–15.

Deschepper C. F. and Flaxman M. 1990. “Glucocorticoid Regulation of Rat Diencephalon Angiotensinogen Production.” *Endocrinology* 126 (2): 963–70.

Deuchars S. A., Spyer K. M. and Gilbey M. P. 1997. “Stimulation Within the Rostral Ventrolateral Medulla Can Evoke Monosynaptic GABAergic IPSPs in Sympathetic Preganglionic Neurons In Vitro.” *Journal of Neurophysiology* 77 (1): 229–35.

Deuschle M., Weber B., Colla M., Müller M., Kniest A. and Heuser I. 1998. “Mineralocorticoid Receptor Also Modulates Basal Activity of Hypothalamus-Pituitary-Adrenocortical System in Humans.” *Neuroendocrinology* 68 (5): 355–60.

Dias M. B., Li A. and Nattie E. E. 2009. “Antagonism of Orexin Receptor-1 in the Retrotrapezoid Nucleus Inhibits the Ventilatory Response to Hypercapnia Predominantly in Wakefulness.” *The Journal of Physiology* 587 (Pt 9): 2059–67.

DiBona G. F. and Jones S. Y. 2001. “Sodium Intake Influences Hemodynamic and Neural Responses to Angiotensin Receptor Blockade in Rostral Ventrolateral Medulla.” *Hypertension* 37 (4): 1114–23.

- Dick T. E., Hsieh Y.-H., Dhingra R. R., Baekey D. M., Galán R. F., Wehrwein E. and Morris K. F. 2014. "Cardiorespiratory Coupling: Common Rhythms in Cardiac, Sympathetic, and Respiratory Activities." *Progress in Brain Research* 209: 191–205.
- Dietrich W. D., Lowry O. H. and Loewy A. D. 1982. "The Distribution of Glutamate, GABA and Aspartate in the Nucleus Tractus Solitarius of the Cat." *Brain Research* 237 (1): 254–60.
- Dillon G. H. and Waldrop T. G.. 1992. "In Vitro Responses of Caudal Hypothalamic Neurons to Hypoxia and Hypercapnia." *Neuroscience* 51 (4): 941–50.
- DiMicco J. A., Samuels B. C., Zaretskaia M. V. and Zaretsky D. V. 2002. "The Dorsomedial Hypothalamus and the Response to Stress: Part Renaissance, Part Revolution." *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior* 71 (3): 469–80.
- DiMicco J. A., Sarkar S., Zaretskaia M. V. and Zaretsky D. V.. 2006. "Stress-Induced Cardiac Stimulation and Fever: Common Hypothalamic Origins and Brainstem Mechanisms." *Autonomic Neuroscience: Basic & Clinical* 126-127 (June): 106–19.
- Diz D. I., Barnes K. L. and Ferrario C. M. 1986. "Contribution of the Vagus Nerve to Angiotensin II Binding Sites in the Canine Medulla." *Brain Research Bulletin* 17 (4): 497–505.
- Diz D. I., Fantz D. L., Benter I. F. and Bosch S. M. 1997. "Acute Depressor Actions of Angiotensin II in the Nucleus of the Solitary Tract Are Mediated by Substance P." *The American Journal of Physiology* 273 (1 Pt 2): R28–34.
- Diz D. I. and Pirro N. T. 1992. "Differential Actions of Angiotensin II and Angiotensin-(1-7) on Transmitter Release." *Hypertension* 19 (2 Suppl): II41.
- Diz D. I., Westwood B., Bosch S. M., Ganten D. and Ferrario C. 1998. "NK1 Receptor Antagonist Blocks Angiotensin II Responses in Renin Transgenic Rat Medulla Oblongata." *Hypertension* 31 (1 Pt 2): 473–79.
- Dong T., Chen J.-W., Tian L.-L., Wang L.-H., Jiang R.-D., Zhang Z., Xu J.-B., et al. 2015. "Role of the Renin-Angiotensin System, Renal Sympathetic Nerve System, and Oxidative Stress in Chronic Foot Shock-Induced Hypertension in Rats." *International Journal of Biological Sciences* 11 (6): 652–63.
- Donoghue S., Fox R. E., Kidd C. and McWilliam P. N. 1981. "The Terminations and Secondary Projections of Myelinated and Non-Myelinated Fibres of the Aortic Nerve in the Cat." *Quarterly Journal of Experimental Physiology* 66 (4): 405–22.
- Dreshaj I. A., Haxhiu M. A., Martin R. J. and Young J. K. 2003. "The Basomedial Hypothalamus Modulates the Ventilatory Response to Hypoxia in Neonatal Rats." *Pediatric Research* 53 (6): 945–49.
- Duan Y. F., Winters R., McCabe P. M., Green E. J., Huang Y. and Schneiderman N. 1997. "Cardiorespiratory Components of Defense Reaction Elicited from Paraventricular Nucleus." *Physiology & Behavior* 61 (2): 325–30.
- Duan H., Zhang Y., Zhang X.-M., Xu H.-H., Shu J., and Xu S.-L.. 2015. "Antinociceptive Roles of Galanin Receptor 1 in Nucleus Accumbens of Rats in a Model of Neuropathic Pain." *Journal of Neuroscience Research*, June.



Ducottet C., Aubert A. and Belzung C. 2004. "Susceptibility to Subchronic Unpredictable Stress Is Related to Individual Reactivity to Threat Stimuli in Mice." *Behavioural Brain Research* 155 (2): 291–99.

Ducottet C. and Belzung C. 2004. "Behaviour in the Elevated plus-Maze Predicts Coping after Subchronic Mild Stress in Mice." *Physiology & Behavior* 81 (3): 417–26.

Duffy A., Jones S., Goodday S. and Bentall R. P. 2015. "Candidate Risk Indicators for Bipolar Disorder: Early Intervention Opportunities in High-Risk Youth." *The International Journal of Neuropsychopharmacology / Official Scientific Journal of the Collegium Internationale Neuropsychopharmacologicum (CINP)*, June.

Dugovic C., Leysen J. E. and Wauquier A. 1989. "Melatonin Modulates the Sensitivity of 5-Hydroxytryptamine-2 Receptor-Mediated Sleep-Wakefulness Regulation in the Rat." *Neuroscience Letters* 104 (3): 320–25.

Dulawa S. C. and Hen R. 2005. "Recent Advances in Animal Models of Chronic Antidepressant Effects: The Novelty-Induced Hypophagia Test." *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 29 (4-5): 771–83. doi:10.1016/j.neubiorev.2005.03.017.

Duncan J. R., Garland M., Myers M. M., Fifer W. P., Yang M., Kinney H. C. and Stark R. I. 2009. "Prenatal Nicotine-Exposure Alters Fetal Autonomic Activity and Medullary Neurotransmitter Receptors: Implications for Sudden Infant Death Syndrome." *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)* 107 (5): 1579–90.

Dyavanapalli J., Jameson H., Dergacheva O., Jain V., Alhusayyen M. and Mendelowitz D. 2014. "Chronic Intermittent Hypoxia–hypercapnia Blunts Heart Rate Responses and Alters Neurotransmission to Cardiac Vagal Neurons." *The Journal of Physiology* 592 (13): 2799–2811.

Eckberg DL. 1997. "Sympathovagal Balance A Critical Appraisal." *Circulation* 96 (9): 3224–32. doi:10.1161/01.CIR.96.9.3224.

Eckberg DL. 2003. "The Human Respiratory Gate." *The Journal of Physiology* 548 (Pt 2): 339–52. doi:10.1113/jphysiol.2002.037192.

Edwards E. and Paton J. F.. 1999. "5-HT(4) Receptors in Nucleus Tractus Solitarii Attenuate Cardiopulmonary Reflex in Anesthetized Rats." *The American Journal of Physiology* 277 (5 Pt 2): H1914–23.

Ellrich J., Messlinger K., Chiang C. Y. and Hu J. W. 2001. "Modulation of Neuronal Activity in the Nucleus Raphé Magnus by the 5-HT(1)-Receptor Agonist Naratriptan in Rat." *Pain* 90 (3): 227–31.

Erdos B., I. Backes, M. L. McCowan, L. F. Hayward, and Scheuer D. A. 2015. " Brain-derived neurotrophic factor modulates angiotensin signaling in the hypothalamus to increase blood pressure in rats." *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 308(6):H612-22.

Errchidi, S., Monteau R. and Hilaire G. 1991. "Noradrenergic Modulation of the Medullary Respiratory Rhythm Generator in the Newborn Rat: An in Vitro Study." *The Journal of Physiology* 443 (November): 477–98.

España R. A., Baldo B. A., Kelley A. E. and Berridge C. W. 2001. "Wake-Promoting and Sleep-Suppressing Actions of Hypocretin (orexin): Basal Forebrain Sites of Action."

*Neuroscience* 106 (4): 699–715.

Ezure K. 1990. "Synaptic Connections between Medullary Respiratory Neurons and Considerations on the Genesis of Respiratory Rhythm." *Progress in Neurobiology* 35 (6): 429–50.

Fagard R. H., Stolarz K., Kuznetsova T., Seidlerova J., Tikhonoff V., Grodzicki T., Nikitin Y., et al. 2007. "Sympathetic Activity, Assessed by Power Spectral Analysis of Heart Rate Variability, in White-Coat, Masked and Sustained Hypertension versus True Normotension." *Journal of Hypertension* 25 (11): 2280–85.

Fan W. and Andresen M. C. 1998. "Differential Frequency-Dependent Reflex Integration of Myelinated and Nonmyelinated Rat Aortic Baroreceptors." *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 275 (2): H632–40.

Fan W., Schild J. H. and Andresen M. C. 1999. "Graded and Dynamic Reflex Summation of Myelinated and Unmyelinated Rat Aortic Baroreceptors." *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 277 (3): R748–56.

Fauchier L., Babuty D., Cosnay P., Autret M. L. and Fauchier J. P. 1997. "Heart Rate Variability in Idiopathic Dilated Cardiomyopathy: Characteristics and Prognostic Value." *Journal of the American College of Cardiology* 30 (4): 1009–14.

Fava M. 2003. "Diagnosis and Definition of Treatment-Resistant Depression." *Biological Psychiatry* 53 (8): 649–59.

Feighner J. P. 1999. "Overview of Antidepressants Currently Used to Treat Anxiety Disorders." *The Journal of Clinical Psychiatry* 60 Suppl 22: 18–22.

Feldman J. L. and Gautier H. 1976. "Interaction of Pulmonary Afferents and Pneumotaxic Center in Control of Respiratory Pattern in Cats." *Journal of Neurophysiology* 39 (1): 31–44.

Feldman J. L. 1986. Neurophysiology of breathing in mammals. In: *Handbook of Physiology. The Nervous System. Intrinsic Regulatory Systems of the Brain*. Bethesda, MD: Am. Physiol. Soc., sect. 1, vol. IV, chapt. 9, p. 463–524

Feldman J. L. and Del Negro C. A. 2006. "Looking for Inspiration: New Perspectives on Respiratory Rhythm." *Nature Reviews. Neuroscience* 7 (3): 232–42.

Feldman J. L. and Janczewski W. A. 2006. "Point:Counterpoint: The Parafacial Respiratory Group (pFRG)/pre-Bötzinger Complex (preBotC) Is the Primary Site of Respiratory Rhythm Generation in the Mammal. Counterpoint: The preBötC Is the Primary Site of Respiratory Rhythm Generation in the Mammal." *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)* 100 (6): 2096–97; discussion 2097–98, 2103–8.

File S. E. and Hyde J. R. 1978. "Can Social Interaction Be Used to Measure Anxiety?" *British Journal of Pharmacology* 62 (1): 19–24.

File S. E. and Seth P. 2003. "A Review of 25 Years of the Social Interaction Test." *European Journal of Pharmacology* 463 (1-3): 35–53.

Fink B. R., Katz R., Reinhold H. and Schoolman A. 1962. "Suprapontine Mechanisms in Regulation of Respiration." *The American Journal of Physiology* 202 (February): 217–20.

- Fletcher A., Forster E. A., Bill D. J., Brown G., Cliffe I. A., Hartley J. E., Jones D. E., et al. 1996. "Electrophysiological, Biochemical, Neurohormonal and Behavioural Studies with WAY-100635, a Potent, Selective and Silent 5-HT<sub>1A</sub> Receptor Antagonist." *Behavioural Brain Research* 73 (1-2): 337–53.
- Follenius M., Brandenberger G. and Hietter B. 1982. "Diurnal Cortisol Peaks and Their Relationships to Meals." *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 55 (4): 757–61.
- Fontes M. A., Tagawa T., Polson J. W., Cavanagh S. J. and Dampney R. A. 2001. "Descending Pathways Mediating Cardiovascular Response from Dorsomedial Hypothalamic Nucleus." *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 280 (6): H2891–2901.
- Forbes N. F., Stewart C. A., Matthews K. and Reid I. C. 1996. "Chronic Mild Stress and Sucrose Consumption: Validity as a Model of Depression." *Physiology & Behavior* 60 (6): 1481–84.
- Fournier S., Steele S., Julien C., Fournier S., Gulemetova R., Caravagna C., Soliz J., Bairam A. and Kinkead R. 2013. "Gestational Stress Promotes Pathological Apneas and Sex-Specific Disruption of Respiratory Control Development in Newborn Rat." *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 33 (2): 563–73.
- Frasure-Smith N., Lespérance F. and Talajic M. 1993. "Depression Following Myocardial Infarction. Impact on 6-Month Survival." *JAMA* 270 (15): 1819–25.
- Frazer A. and Benmansour S. 2002. "Delayed Pharmacological Effects of Antidepressants." *Molecular Psychiatry* 7 Suppl 1: S23–28.
- Freeman L. J., Conway A. V. and Nixon P. G. 1986. "Heart Rate Response, Emotional Disturbance and Hyperventilation." *Journal of Psychosomatic Research* 30 (4): 429–36.
- Fuhrman C. and Chouaïd C.. 2004. "Concordance between two variables: numerical approaches (qualitative observations - the kappa coefficient; quantitative measures." *Revue Des Maladies Respiratoires* 21 (1): 123–25.
- Funder J. W. 2005. "Mineralocorticoid Receptors: Distribution and Activation." *Heart Failure Reviews* 10 (1): 15–22.
- Fuxe K. 1965. "Evidence for the existence of monoamine neurons in the central nervous system. 3. The monoamine nerve terminal." *Zeitschrift für zellforschung und mikroskopische anatomie (vienna, austria: 1948)* 65 (February): 573–96.
- Gadek-Michalska A., Tadeusz J., Rachwalska P. and Bugajski J. 2015. "Chronic Stress Adaptation of the Nitric Oxide Synthases and IL-1 $\beta$  Levels in Brain Structures and Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis Activity Induced by Homotypic Stress." *Journal of Physiology and Pharmacology: An Official Journal of the Polish Physiological Society* 66 (3): 427–40.
- Gao K and Mason P. 1997. "Somatodendritic and axonal anatomy of intracellularly labeled serotonergic neurons in the rat medulla." *J Comp Neurol.* 389(2):309-28.
- Gao K and Mason P. 2001. "Physiological and anatomic evidence for functional subclasses of serotonergic raphe magnus cells." *J Comp Neurol.* 439(4):426-39.

- Gao L., Wang W., Li Y.-L., Schultz H. D., Liu D., Cornish K. G. and Zucker I. H. 2004. "Superoxide Mediates Sympathoexcitation in Heart Failure Roles of Angiotensin II and NAD(P)H Oxidase." *Circulation Research* 95 (9): 937–44.
- Garcia-Larrea L. 2012. "Objective Pain Diagnostics: Clinical Neurophysiology." *Neurophysiologie Clinique = Clinical Neurophysiology* 42 (4): 187–97.
- Garzón J., Fuentes J. A. and Del Rio J. 1979. "Antidepressants Selectively Antagonize the Hyperactivity Induced in Rats by Long-Term Isolation." *European Journal of Pharmacology* 59 (3-4): 293–96.
- Gaudin-Chazal G., Portalier P., Puizillout J. J. and Vigier D. 1983. "Simultaneous Visualization of Aortic and [3H]5-Hydroxytryptamine-Accumulating Cell Bodies in the Nodose Ganglion of the Cat." *The Journal of Physiology* 337 (April): 321–30.
- Gau R., Sévoz-Couche C., Hamon M. and Bernard J.-F.. 2013. "Noxious Stimulation Excites Serotonergic Neurons: A Comparison between the Lateral Paragigantocellular Reticular and the Raphe Magnus Nuclei." *Pain* 154 (5): 647–59.
- Gebber G. L. and Snyder D. W. 1970. "Hypothalamic Control of Baroreceptor Reflexes." *The American Journal of Physiology* 218 (1): 124–31.
- Gehi A., Mangano D., Pipkin S., Browner W. S. and Whooley M. A. 2005. "Depression and Heart Rate Variability in Patients With Stable Coronary Heart Disease." *Archives of General Psychiatry* 62 (6): 661–66.
- Gelenberg A. J. and Chesen C. L. 2000. "How Fast Are Antidepressants?" *The Journal of Clinical Psychiatry* 61 (10): 712–21.
- Gestreau C., Heitzmann D., Thomas J., Dubreuil V., Bandulik S., Reichold M., Bendahhou S., et al. 2010. "Task2 Potassium Channels Set Central Respiratory CO<sub>2</sub> and O<sub>2</sub> Sensitivity." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (5): 2325–30.
- Glassman A. H., O'Connor C. M., Califf R. M., Swedberg K., Schwartz P., Bigger J. T., Krishnan K. R. R., et al. 2002. "Sertraline Treatment of Major Depression in Patients with Acute MI or Unstable Angina." *JAMA* 288 (6): 701–9.
- Glaum S. R., Brooks P. A., Spyer K. M. and Miller R. J. 1992. "5-Hydroxytryptamine-3 Receptors Modulate Synaptic Activity in the Rat Nucleus Tractus Solitarius in Vitro." *Brain Research* 589 (1): 62–68.
- Goddard A. W., Mason G. F., Appel M., Rothman D. L., Gueorguieva R., Behar K. L. and Krystal J. H.. 2004. "Impaired GABA Neuronal Response to Acute Benzodiazepine Administration in Panic Disorder." *The American Journal of Psychiatry* 161 (12): 2186–93.
- Goddard A. W., Mason G. F., Almai A., Rothman D. L., Behar K. L., Petroff O. A., Charney D. S. and Krystal J. H. 2001. "Reductions in Occipital Cortex GABA Levels in Panic Disorder Detected with 1h-Magnetic Resonance Spectroscopy." *Archives of General Psychiatry* 58 (6): 556–61.
- Gomes V. C., Hassan W., Maissonette S., Johnson L. R., Ramos A. and Landeira-Fernandez J. 2013. "Behavioral Evaluation of Eight Rat Lines Selected for High and Low Anxiety-Related Responses." *Behavioural Brain Research* 257 (November): 39–48.

- Granata A. R. and Reis D. J. 1983. "Release of [3H]l-Glutamine Acid (l-Glu) and [3H]d-Aspartic Acid (d-Asp) in the Area of Nucleus Tractus Solitarius in Vivo Produced by Stimulation of the Vagus Nerve." *Brain Research* 259 (1): 77–93.
- Grassi M., Caldirola D., Vanni G., Guerriero G., Piccinni M., Valchera A., and Perna G.. 2013. "Baseline Respiratory Parameters in Panic Disorder: A Meta-Analysis." *Journal of Affective Disorders* 146 (2): 158–73. doi:10.1016/j.jad.2012.08.034.
- Griebel G., Simiand J., Serradeil-Le Gal C., Wagnon J., Pascal M., Scatton B., Maffrand J.-P. and Soubrie P. 2002. "Anxiolytic- and Antidepressant-like Effects of the Non-Peptide Vasopressin V1b Receptor Antagonist, SSR149415, Suggest an Innovative Approach for the Treatment of Stress-Related Disorders." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (9): 6370–75.
- Grippe A. J. and Johnson A. K. 2002. "Biological Mechanisms in the Relationship between Depression and Heart Disease." *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 26 (8): 941–62.
- Grippe A. J., Moffitt J. A. and Johnson A. K. 2002. "Cardiovascular Alterations and Autonomic Imbalance in an Experimental Model of Depression." *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 282 (5): R1333–41.
- Grippe A. J., Beltz T. G. and Johnson A. K. 2003. "Behavioral and Cardiovascular Changes in the Chronic Mild Stress Model of Depression." *Physiology & Behavior* 78 (4-5): 703–10.
- Grippe, A. J., Sullivan N. R., Damjanoska K. J., Crane J. W., Carrasco G. A., Shi J., Chen Z., Garcia F., Muma N. A. and Van de Kar L. D. 2005. "Chronic Mild Stress Induces Behavioral and Physiological Changes, and May Alter Serotonin 1A Receptor Function, in Male and Cycling Female Rats." *Psychopharmacology* 179 (4): 769–80.
- Grippe A. J., Beltz T. G., Weiss R. M. and Johnson A. K. 2006. "The Effects of Chronic Fluoxetine Treatment on Chronic Mild Stress-Induced Cardiovascular Changes and Anhedonia." *Biological Psychiatry* 59 (4): 309–16.
- Grippe A. J., Moffitt J. A., Johnson A. K. 2008. "Evaluation of Baroreceptor Reflex Function in the Chronic Mild Stress Rodent Model of Depression." *Psychosomatic Medicine* 70 (4): 435–43. doi:10.1097/PSY.0b013e31816ff7dd.
- Gustafson E. L., Durkin M. M., Bard J. A., Zgombick J. and Branchek T. A. 1996. "A Receptor Autoradiographic and in Situ Hybridization Analysis of the Distribution of the 5-HT<sub>7</sub> Receptor in Rat Brain." *British Journal of Pharmacology* 117 (4): 657–66.
- Guyenet P. G., Filtz T. M. and Donaldson S. R. 1987. "Role of Excitatory Amino Acids in Rat Vagal and Sympathetic Baroreflexes." *Brain Research* 407 (2): 272–84.
- Guyenet P. G., Mulkey D. K., Stornetta R. L., and Bayliss D. A.. 2005. "Regulation of Ventral Surface Chemoreceptors by the Central Respiratory Pattern Generator." *The Journal of Neuroscience* 25 (39): 8938–47.
- Guyenet P. G., Stornetta R. L., Abbott S. B. G., Depuy S. D., Fortuna M. G. and R. Kanbar. 2010. "Central CO<sub>2</sub> Chemoreception and Integrated Neural Mechanisms of Cardiovascular and Respiratory Control." *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)* 108 (4): 995–1002.
- Hagan J. J., Leslie R. A., Patel S., Evans M. L., Wattam T. A., Holmes S., Benham C. D., et



- al. 1999. "Orexin A Activates Locus Coeruleus Cell Firing and Increases Arousal in the Rat." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 (19): 10911–16.
- Hakumäki M. O. 1987. "Seventy Years of the Bainbridge Reflex." *Acta Physiologica Scandinavica* 130 (2): 177–85.
- Hamalainen M. M. and Lovick T. A. 1997. "Role of Nitric Oxide and Serotonin in Modulation of the Cardiovascular Defence Response Evoked by Stimulation in the Periaqueductal Grey Matter in Rats." *Neuroscience Letters* 229 (2): 105–8.
- Harris G. C., Wimmer M. and Aston-Jones G. 2005. "A Role for Lateral Hypothalamic Orexin Neurons in Reward Seeking." *Nature* 437 (7058): 556–59.
- Hasegawa S., Nishi K., Watanabe A., Overstreet D. H. and Diksic M. 2006. "Brain 5-HT Synthesis in the Flinders Sensitive Line Rat Model of Depression: An Autoradiographic Study." *Neurochemistry International* 48 (5): 358–66.
- Hayakawa T., Maeda S., Tanaka K. and Seki M. 2005. "Fine Structural Survey of the Intermediate Subnucleus of the Nucleus Tractus Solitarii and Its Glossopharyngeal Afferent Terminals." *Anatomy and Embryology* 210 (3): 235–44.
- Hayley S., Du L., Litteljohn D., Palkovits M., Faludi G., Merali Z., Poulter M. O. and Anisman H. 2015. "Gender and Brain Regions Specific Differences in Brain Derived Neurotrophic Factor Protein Levels of Depressed Individuals Who Died through Suicide." *Neuroscience Letters* 600 (May): 12–16.
- Hayward L. F. 2001. "Evidence for Alpha-2 Adrenoreceptor Modulation of Arterial Chemoreflexes in the Caudal Solitary Nucleus of the Rat." *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 281 (5): R1464–73.
- Healy D. P., Rettig R., Nguyen T. and Printz M. P. 1989. "Quantitative Autoradiography of Angiotensin II Receptors in the Rat Solitary-Vagal Area: Effects of Nodose Ganglionectomy or Sinoaortic Denervation." *Brain Research* 484 (1–2): 1–12.
- "Heart Rate Variability: Standards of Measurement, Physiological Interpretation and Clinical Use. Task Force of the European Society of Cardiology and the North American Society of Pacing and Electrophysiology." 1996. *Circulation* 93 (5): 1043–65.
- Heistad D. D., Wakisaka Y., Miller J., Chu Y., and Pena-Silva R.. 2009. "Novel Aspects of Oxidative Stress in Cardiovascular Diseases." *Circulation Journal: Official Journal of the Japanese Circulation Society* 73 (2): 201–7.
- Heritch A. J., Henderson K. and Westfall T. C. 1990. "Effects of Social Isolation on Brain Catecholamines and Forced Swimming in Rats: Prevention by Antidepressant Treatment." *Journal of Psychiatric Research* 24 (3): 251–58.
- Herman J. P., Watson S. J. and Spencer R. L. 1999. "Defense of Adrenocorticosteroid Receptor Expression in Rat Hippocampus: Effects of Stress and Strain." *Endocrinology* 140 (9): 3981–91.
- Herrero A. I., Sandi C. and Venero C. 2006. "Individual Differences in Anxiety Trait Are Related to Spatial Learning Abilities and Hippocampal Expression of Mineralocorticoid Receptors." *Neurobiology of Learning and Memory* 86 (2): 150–59.

Hess W. R. and Brugger M. 1943. Das subkortikake Zenrrumder affektriven Abwehrreaktion. *Helv.Physiol.Acta.* 1:33–52.

Hess W. R. and Akert K. 1955. “Experimental Data on Role of Hypothalamus in Mechanism of Emotional Behavior.” *A.M.A. Archives of Neurology and Psychiatry* 73 (2): 127–29.

Hilaire G., Monteau R. and Errchidi S. 1989. “Possible Modulation of the Medullary Respiratory Rhythm Generator by the Noradrenergic A5 Area: An in Vitro Study in the Newborn Rat.” *Brain Research* 485 (2): 325–32.

Hilton S. M. 1982. “The Defence-Arousal System and Its Relevance for Circulatory and Respiratory Control.” *The Journal of Experimental Biology* 100 (October): 159–74.

Hirsch J. A. and Bishop B. 1981. “Respiratory Sinus Arrhythmia in Humans: How Breathing Pattern Modulates Heart Rate.” *The American Journal of Physiology* 241 (4): H620–29.

Hockman C. H. and Talesnik J.. 1971. “Central Nervous System Modulation of Baroreceptor Input.” *The American Journal of Physiology* 221 (2): 515–19.

Höhle S., Spitznagel H., Rascher W., Culman J. and Unger T. 1995. “Angiotensin AT1 Receptor-Mediated Vasopressin Release and Drinking Are Potentiated by an AT2 Receptor Antagonist.” *European Journal of Pharmacology* 275 (3): 277–82.

Horn E. M. and Waldrop T. G. 1994. “Modulation of the Respiratory Responses to Hypoxia and Hypercapnia by Synaptic Input onto Caudal Hypothalamic Neurons.” *Brain Research* 664 (1-2): 25–33.

Horn E. M. and Waldrop TG. 1998. “Suprapontine Control of Respiration.” *Respiration Physiology* 114 (3): 201–11.

Houle M. S. and Billman G. E. 1999. “Low-Frequency Component of the Heart Rate Variability Spectrum: A Poor Marker of Sympathetic Activity.” *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 276 (1): H215–23.

Housley G. D., Martin-Body R. L., Dawson N. J. and Sinclair J. D. 1987. “Brain Stem Projections of the Glossopharyngeal Nerve and Its Carotid Sinus Branch in the Rat.” *Neuroscience* 22 (1): 237–50.

Hoyer D., Pazos A., Probst A. and Palacios J. M. 1986. “Serotonin Receptors in the Human Brain. II. Characterization and Autoradiographic Localization of 5-HT<sub>1C</sub> and 5-HT<sub>2</sub> Recognition Sites.” *Brain Research* 376 (1): 97–107.

Hoyer D., Hannon J. P. and Martin G. R. 2002. “Molecular, Pharmacological and Functional Diversity of 5-HT Receptors.” *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior* 71 (4): 533–54.

Huang J. and Pickel V. M. 2002. “Differential Distribution of 5HT<sub>2A</sub> and NMDA Receptors in Single Cells within the Rat Medial Nucleus of the Solitary Tract.” *Synapse (New York, N.Y.)* 44 (2): 64–75.

Huang S.-C., Dai Y.-W. E., Lee Y.-H., Chiou L.-C. and Hwang L.-L. 2010. “Orexins Depolarize Rostral Ventrolateral Medulla Neurons and Increase Arterial Pressure and Heart Rate in Rats Mainly via Orexin 2 Receptors.” *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 334 (2): 522–29. doi:10.1124/jpet.110.167791.

- Huckstepp R. T. R. and Dale N. 2011. "Redefining the Components of Central CO<sub>2</sub> Chemosensitivity – towards a Better Understanding of Mechanism." *The Journal of Physiology* 589 (Pt 23): 5561–79.
- Imbe H., Murakami S., Okamoto K., Iwai-Liao Y. and Senba E. 2004. "The Effects of Acute and Chronic Restraint Stress on Activation of ERK in the Rostral Ventromedial Medulla and Locus Coeruleus." *Pain* 112 (3): 361–71.
- Ising M. and Holsboer F. 2006. "Genetics of Stress Response and Stress-Related Disorders." *Dialogues in Clinical Neuroscience* 8 (4): 433–44.
- Isom G. E. and Elshowihy R. M. 1982. "Interaction of Acute and Chronic Stress with Respiration: Modification by Naloxone." *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior* 16 (4): 599–603.
- Janczewski W. A. and Feldman J. L. 2006. "Distinct Rhythm Generators for Inspiration and Expiration in the Juvenile Rat." *The Journal of Physiology* 570 (Pt 2): 407–20.
- Jeggo R. D., Kellett D. O., Wang Y., Ramage A. G. and Jordan D. 2005. "The Role of Central 5-HT<sub>3</sub> Receptors in Vagal Reflex Inputs to Neurones in the Nucleus Tractus Solitarius of Anaesthetized Rats." *The Journal of Physiology* 566 (Pt 3): 939–53.
- Jensen L. L., Harding J. W. and Wright J. W. 1992. "Role of Paraventricular Nucleus in Control of Blood Pressure and Drinking in Rats." *American Journal of Physiology - Renal Physiology* 262 (6): F1068–75.
- Jeske I., Reis D. J. and Milner T. A. 1995. "Neurons in the Barosensory Area of the Caudal Ventrolateral Medulla Project Monosynaptically on to Sympathoexcitatory Bulbospinal Neurons in the Rostral Ventrolateral Medulla." *Neuroscience* 65 (2): 343–53.
- Johnson P. L., Samuels B. C., Fitz S. D., Lightman S. L., Lowry C. A. and A. Shekhar. 2012. "Activation of the Orexin 1 Receptor Is a Critical Component of CO<sub>2</sub>-Mediated Anxiety and Hypertension but Not Bradycardia." *Neuropsychopharmacology* 37 (8): 1911–22.
- Johnston A. L. and File S. E. 1991. "Sex Differences in Animal Tests of Anxiety." *Physiology & Behavior* 49 (2): 245–50.
- Jordan D. and Spyer K. M. 1977. "Studies on the Termination of Sinus Nerve Afferents." *Pflügers Archiv: European Journal of Physiology* 369 (1): 65–73.
- Joseph C. N., Porta C., Casucci G., Casiraghi N., Maffei M., Rossi M. and Bernardi L. 2005. "Slow Breathing Improves Arterial Baroreflex Sensitivity and Decreases Blood Pressure in Essential." *Hypertension* 46 (4): 714–18.
- Kabir M. M., Beig M. I., Baumert M., Trombini M., Mastorci F., Sgoifo A., Walker F. R., Day T. A. and Nalivaiko E. 2010. "Respiratory Pattern in Awake Rats: Effects of Motor Activity and of Alerting Stimuli." *Physiology & Behavior* 101 (1): 22–31.
- Kalia M. and Mesulam M. M. 1980. "Brain Stem Projections of Sensory and Motor Components of the Vagus Complex in the Cat: I. The Cervical Vagus and Nodose Ganglion." *The Journal of Comparative Neurology* 193 (2): 435–65.
- Kalueff A. V. and Tuohimaa P. 2004. "Experimental Modeling of Anxiety and Depression." *Acta Neurobiologiae Experimentalis* 64 (4): 439–48.



- Katz R. J. 1981. "Animal Model of Depression: Effects of Electroconvulsive Shock Therapy." *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 5 (2): 273–77.
- Katz R. J. and Hersh S. 1981. "Amitriptyline and Scopolamine in an Animal Model of Depression." *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 5 (2): 265–71.
- Katz R. J., Roth K. A. and Carroll B. J. 1981. "Acute and Chronic Stress Effects on Open Field Activity in the Rat: Implications for a Model of Depression." *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 5 (2): 247–51.
- Katz R. J. 1982. "Animal Model of Depression: Pharmacological Sensitivity of a Hedonic Deficit." *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior* 16 (6): 965–68.
- Kawachi I., Sparrow D., Vokonas P. S. and Weiss S. T. 1994. "Symptoms of Anxiety and Risk of Coronary Heart Disease. The Normative Aging Study." *Circulation* 90 (5): 2225–29.
- Kawachi I., Sparrow D., Vokonas P. S. and Weiss S. T. 1995. "Decreased Heart Rate Variability in Men with Phobic Anxiety (data from the Normative Aging Study)." *The American Journal of Cardiology* 75 (14): 882–85.
- Kayaba Y., Nakamura A., Kasuya Y., Ohuchi T., Yanagisawa M., Komuro I., Fukuda Y. and Kuwaki T. 2003. "Attenuated Defense Response and Low Basal Blood Pressure in Orexin Knockout Mice." *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 285 (3): R581–93.
- Kc P., Haxhiu M. A., Tolentino-Silva F. P., Wu M., Ovid Trough C. and Mack S. O. 2002. "Paraventricular Vasopressin-Containing Neurons Project to Brain Stem and Spinal Cord Respiratory-Related Sites." *Respiratory Physiology & Neurobiology* 133 (1–2): 75–88.
- Keller M. C., Neale M. C. and Kendler K. S.. 2007. "Association of Different Adverse Life Events with Distinct Patterns of Depressive Symptoms." *The American Journal of Psychiatry* 164 (10): 1521–29; quiz 1622.
- Kendler K. S., Karkowski L. M. and Prescott C. A. 1999. "Causal Relationship between Stressful Life Events and the Onset of Major Depression." *The American Journal of Psychiatry* 156 (6): 837–41.
- Kessler R. C. 1997. "The Effects of Stressful Life Events on Depression." *Annual Review of Psychology* 48: 191–214.
- Kessler R. C., Petukhova M., Sampson N. A., Zaslavsky A. M. and Wittchen H.-U. 2012. "Twelve-Month And Lifetime Prevalence and Lifetime Morbid Risk of Anxiety and Mood Disorders in the United States." *International Journal of Methods in Psychiatric Research* 21 (3): 169–84.
- Kioukia-Fougia N., Antoniou K., Bekris S., Liapi C., Christofidis I. and Papadopoulou-Daifoti Z. 2002. "The Effects of Stress Exposure on the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis, Thymus, Thyroid Hormones and Glucose Levels." *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* 26 (5): 823–30.
- Kleiger R. E., Miller J. P., Bigger J. T. and Moss A. J. 1987. "Decreased Heart Rate Variability and Its Association with Increased Mortality after Acute Myocardial Infarction." *The American Journal of Cardiology* 59 (4): 256–62.

- Kobori H., Nangaku M., Navar L. G. and Nishiyama A. 2007. "The Intrarenal Renin-Angiotensin System: From Physiology to the Pathobiology of Hypertension and Kidney Disease." *Pharmacological Reviews* 59 (3): 251–87.
- Ko M.-C., Hung Y.-H., Ho P.-Y., Yang Y.-L. and Lu K.-T.. 2014. "Neonatal Glucocorticoid Treatment Increased Depression-like Behaviour in Adult Rats." *The International Journal of Neuropsychopharmacology / Official Scientific Journal of the Collegium Internationale Neuropsychopharmacologicum (CINP)* 17 (12): 1995–2004.
- Koolhaas J. M., De Boer S. F., De Rutter A. J., Meerlo P. and Sgoifo A. 1997. "Social Stress in Rats and Mice." *Acta Physiologica Scandinavica. Supplementum* 640: 69–72.
- Krakov B. J., Ulibarri V. A., Moore B. A. and McIver N. D. 2015. "Posttraumatic Stress Disorder and Sleep-Disordered Breathing: A Review of Comorbidity Research." *Sleep Medicine Reviews* 24 (December): 37–45.
- Krishnan V., Han M.-H., Graham D. L., Berton O., Renthal W., Russo S. J., Laplant Q., et al. 2007. "Molecular Adaptations Underlying Susceptibility and Resistance to Social Defeat in Brain Reward Regions." *Cell* 131 (2): 391–404.
- Kubin L., Alheid G. F., Zuperku E. J. and McCrimmon D. R.. 2006. "Central Pathways of Pulmonary and Lower Airway Vagal Afferents." *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)* 101 (2): 618–27.
- Kubo T. and Kihara M. 1991. "Unilateral Blockade of Excitatory Amino Acid Receptors in the Nucleus Tractus Solitarius Produces an Inhibition of Baroreflexes in Rats." *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 343 (3): 317–22.
- Kudielka B. M., Buske-Kirschbaum A., Hellhammer D. H. and Kirschbaum C. 2004. "HPA Axis Responses to Laboratory Psychosocial Stress in Healthy Elderly Adults, Younger Adults, and Children: Impact of Age and Gender." *Psychoneuroendocrinology* 29 (1): 83–98.
- Kunze A. E., Arntz A. and Kindt M. 2015. "Fear Conditioning with Film Clips: A Complex Associative Learning Paradigm." *Journal of Behavior Therapy and Experimental Psychiatry* 47 (June): 42–50.
- Kuramochi M. and Nakamura S. 2009. "Effects of Postnatal Isolation Rearing and Antidepressant Treatment on the Density of Serotonergic and Noradrenergic Axons and Depressive Behavior in Rats." *Neuroscience* 163 (1): 448–55.
- Kuwahara M., Yagyu K., Ishii K., Hashimoto S., Tsubone H. and Sugano S. 1994. "Power Spectral Analysis of Heart Rate Variability as a New Method for Assessing Autonomic Activity in the Rat." *Journal of Electrocardiology* 27 (4): 333–37.
- Laborit H. 1988. *Encyclopaedia Universalis Corpus* 17:271-272
- Ladwig K. H., Kieser M., König J., Breithardt G. and Borggrefe M. 1991. "Affective Disorders and Survival after Acute Myocardial Infarction. Results from the Post-Infarction Late Potential Study." *European Heart Journal* 12 (9): 959–64.
- Laguzzi R., Reis D. J. and Talman W. T. 1984. "Modulation of Cardiovascular and Electrocortical Activity through Serotonergic Mechanisms in the Nucleus Tractus Solitarius of the Rat." *Brain Research* 304 (2): 321–28.

- Laguzzi R. 2003. "Serotonin<sub>2</sub> Receptors in the Nucleus Tractus Solitarius: Characterization and Role in the Baroreceptor Reflex Arc." *Cellular and Molecular Neurobiology* 23 (4-5): 709–26.
- Langley J. N. 1903. "The Autonomic Nervous System." *Brain* 26 (1): 1–26.
- Lanza G. A., Pedrotti P., Rebuzzi A. G., Pasceri V., Quaranta G. and Maseri A. 1997. "Usefulness of the Addition of Heart Rate Variability to Holter Monitoring in Predicting in-Hospital Cardiac Events in Patients with Unstable Angina Pectoris." *The American Journal of Cardiology* 80 (3): 263–67.
- Lapiz M. D. S., Fulford A., Muchimapura S., Mason R., Parker T. and Marsden C. A. 2003. "Influence of Postweaning Social Isolation in the Rat on Brain Development, Conditioned Behavior, and Neurotransmission." *Neuroscience and Behavioral Physiology* 33 (1): 13–29.
- Laporte A. M., Koscielniak T., Ponchant M., Vergé D., Hamon M. and Gozlan H. 1992. "Quantitative Autoradiographic Mapping of 5-HT<sub>3</sub> Receptors in the Rat CNS Using [<sup>125</sup>I]iodo-Zacopride and [<sup>3</sup>H]zacopride as Radioligands." *Synapse (New York, N.Y.)* 10 (4): 271–81.
- Larnicol N., Wallois F., Berquin P., Gros F. and Rose D. 1994. "C-Fos-like Immunoreactivity in the Cat's Neuraxis Following Moderate Hypoxia or Hypercapnia." *Journal of Physiology, Paris* 88 (1): 81–88.
- La Rovere M. T., Pinna G. D., Maestri R., Robbi E., Caporotondi A., Guazzotti G., Sleight P. and Febo O. 2009. "Prognostic Implications of Baroreflex Sensitivity in Heart Failure Patients in the Beta-Blocking Era." *Journal of the American College of Cardiology* 53 (2): 193–99.
- La Rovere M. T., Bigger J. T., Marcus F. I., Mortara A. and Schwartz P. J. 1998. "Baroreflex Sensitivity and Heart-Rate Variability in Prediction of Total Cardiac Mortality after Myocardial Infarction. ATRAMI (Autonomic Tone and Reflexes After Myocardial Infarction) Investigators." *Lancet* 351 (9101): 478–84.
- La Rovere M. T., Gnemmi M. and Vaccarini C. 2001. "[Baroreflex sensitivity]." *Italian Heart Journal. Supplement: Official Journal of the Italian Federation of Cardiology* 2 (5): 472–77.
- Laude D., Baudrie V. and Elghozi J.-L. 2009. "Tuning of the Sequence Technique." *Ieee Engineering in Medicine and Biology Magazine* 28 (6): 30–34.
- Laude D., Elghozi J.-L., Girard A., Bellard E., Bouhaddi M., Castiglioni P., Cerutti C., Cividjian A., Di Rienzo M., et al. 2004. "Comparison of Various Techniques Used to Estimate Spontaneous Baroreflex Sensitivity (the EuroBaVar Study)." *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 286 (1): R226–31.
- Lazarenko R. M., Stornetta R. L., Bayliss D. A. and Guyenet P. G. 2011. "Orexin A Activates Retrotrapezoid Neurons in Mice." *Respiratory Physiology & Neurobiology* 175 (2): 283–87.
- Lazartigues E., Dunlay S. M., Loihl A. K., Sinnayah P., Lang J. A., Espelund J. J., C. D. Sigmund, and Davisson R. L. 2002. "Brain-Selective Overexpression of Angiotensin (AT<sub>1</sub>) Receptors Causes Enhanced Cardiovascular Sensitivity in Transgenic Mice." *Circulation Research* 90 (5): 617–24.
- Leinonen E., Skarstein J., Behnke K., Agren H. and Helsdingen J. T. 1999. "Efficacy and Tolerability of Mirtazapine versus Citalopram: A Double-Blind, Randomized Study in Patients with Major Depressive Disorder. Nordic Antidepressant Study Group." *International Clinical Psychopharmacology* 14 (6): 329–37.

- Lenkei Z., Palkovits M., Corvol P. and Llorens-Cortès C. 1997. "Expression of Angiotensin Type-1 (AT1) and Type-2 (AT2) Receptor mRNAs in the Adult Rat Brain: A Functional Neuroanatomical Review." *Frontiers in Neuroendocrinology* 18 (4): 383–439.
- Leonard B. E. 1997. "The Role of Noradrenaline in Depression: A Review." *Journal of Psychopharmacology (Oxford, England)* 11 (4 Suppl): S39–47.
- Lewis S. J., Allen A. M., Verberne A. J. M., R. Figdor, Jarrott B. and Mendelsohn F. A. O. 1986. "Angiotensin II Receptor Binding in the Rat Nucleus Tractus Solitarius Is Reduced after Unilateral Nodose Ganglionectomy or Vagotomy." *European Journal of Pharmacology* 125 (2): 305–7.
- Ley R. 1985. "Agoraphobia, the Panic Attack and the Hyperventilation Syndrome." *Behaviour Research and Therapy* 23 (1): 79–81.
- Li A. and Nattie E. 2010. "Antagonism of Rat Orexin Receptors by Almorexant Attenuates Central Chemoreception in Wakefulness in the Active Period of the Diurnal Cycle." *The Journal of Physiology* 588 (Pt 15): 2935–44.
- Liaudat A. C., Rodríguez N., Chen S., Romanini M. C., Vivas A., Rolando A., Gauna H. and Mayer N. 2015. "Adrenal Response of Male Rats Exposed to Prenatal Stress and Early Postnatal Stimulation." *Biotechnic & Histochemistry: Official Publication of the Biological Stain Commission*, April, 1–7.
- Lipski J., McAllen R. M. and Spyer K. M. 1977. "The Carotid Chemoreceptor Input to the Respiratory Neurones of the Nucleus of Tractus Solitarius." *The Journal of Physiology* 269 (3): 797–810.
- Lister R. G. 1987. "The Use of a plus-Maze to Measure Anxiety in the Mouse." *Psychopharmacology* 92 (2): 180–85.
- Liu D., Diorio J., Tannenbaum B., Caldji C., Francis D., Freedman A., Sharma S., Pearson D., Plotsky P. M. and Meaney M. J. 1997. "Maternal Care, Hippocampal Glucocorticoid Receptors, and Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Responses to Stress." *Science (New York, N.Y.)* 277 (5332): 1659–62.
- Liu D., Caldji C., Sharma S., Plotsky P. M. and Meaney M. J. 2000. "Influence of Neonatal Rearing Conditions on Stress-Induced Adrenocorticotropin Responses and Norepinephrine Release in the Hypothalamic Paraventricular Nucleus." *Journal of Neuroendocrinology* 12 (1): 5–12.
- Liu H.-R., Fang X.-Y., Wu H.-G., Wu L.-Y., Li J., Weng Z.-J., Guo X.-X., and Li Y.-G.. 2015. "Effects of Electroacupuncture on Corticotropin-Releasing Hormone in Rats with Chronic Visceral Hypersensitivity." *World Journal of Gastroenterology: WJG* 21 (23): 7181–90.
- Li Y. W., Bayliss D. A. and Guyenet P. G. 1995. "C1 Neurons of Neonatal Rats: Intrinsic Beating Properties and Alpha 2-Adrenergic Receptors." *The American Journal of Physiology* 269 (6 Pt 2): R1356–69.
- Li Y.-W. and Guyenet P. G. 1996. "Angiotensin II Decreases a Resting K<sup>+</sup> Conductance in Rat Bulbospinal Neurons of the C1 Area." *Circulation Research* 78 (2): 274–82.
- Lombardi F., Sandrone G., Pernpruner S., Sala R., Garimoldi M., Cerutti S., Baselli G.,

- Pagani M., and Malliani A. 1987. "Heart Rate Variability as an Index of Sympathovagal Interaction after Acute Myocardial Infarction." *The American Journal of Cardiology* 60 (16): 1239–45.
- Lopez-Duran N. L., McGinnis E., Kuhlman K., Geiss E., Vargas I. and Mayer S. 2015. "HPA-Axis Stress Reactivity in Youth Depression: Evidence of Impaired Regulatory Processes in Depressed Boys." *Stress (Amsterdam, Netherlands)*, June, 1–9.
- López-Muñoz F., Alamo C., and García-García P. 2011. "The Discovery of Chlordiazepoxide and the Clinical Introduction of Benzodiazepines: Half a Century of Anxiolytic Drugs." *Journal of Anxiety Disorders* 25 (4): 554–62.
- Lordi, B., Patin V., Protais P., Mellier D., and Caston J. 2000. "Chronic Stress in Pregnant Rats: Effects on Growth Rate, Anxiety and Memory Capabilities of the Offspring." *International Journal of Psychophysiology: Official Journal of the International Organization of Psychophysiology* 37 (2): 195–205.
- Lotzin A., Schiborr J., Barkmann C., Romer G. and Ramsauer B. 2015. "Maternal Emotion Dysregulation Is Related to Heightened Mother-Infant Synchrony of Facial Affect." *Development and Psychopathology*, June, 1–13.
- Louvar H., Maccari S., Lesage J., Léonhardt M., Dickes-Coopman A. and Darnaudéry M. 2006. "Effects of a Single Footshock Followed by Situational Reminders on HPA Axis and Behaviour in the Aversive Context in Male and Female Rats." *Psychoneuroendocrinology* 31 (1): 92–99.
- Lovick T. A. 1992. "Midbrain Influences on Ventrolateral Medullo-Spinal Neurones in the Rat." *Experimental Brain Research* 90 (1): 147–52.
- Lumb B. M. and Lovick T. A. 1993. "The Rostral Hypothalamus: An Area for the Integration of Autonomic and Sensory Responsiveness." *Journal of Neurophysiology* 70 (4): 1570–77.
- Lynch K. R., Hawelu-Johnson C. L. and Guyenet P. G. 1987. "Localization of Brain Angiotensinogen mRNA by Hybridization Histochemistry." *Brain Research* 388 (2): 149–58.
- Maccari S., Darnaudery M., Morley-Fletcher S., Zuen A. R., Cinque C. and Van Reeth O. 2003. "Prenatal Stress and Long-Term Consequences: Implications of Glucocorticoid Hormones." *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 27 (1-2): 119–27.
- Machado B. H., L. Bonagamba G. H., Dun S. L., Kwok E. H and Dun N. J. 2002. "Pressor Response to Microinjection of Orexin/hypocretin into Rostral Ventrolateral Medulla of Awake Rats." *Regulatory Peptides*, Special Issue: Orexin, 104 (1–3): 75–81.
- Macri S., Granstrem O., Shumilina M., Gomes dos Santos F. J. A., Berry A., Saso L. and Laviola G. 2009. "Resilience and Vulnerability Are Dose-Dependently Related to Neonatal Stressors in Mice." *Hormones and Behavior* 56 (4): 391–98.
- Maley B. and Elde R. 1982. "The Ultrastructural Localization of Serotonin Immunoreactivity within the Nucleus of the Solitary Tract of the Cat." *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 2 (10): 1499–1506.
- Malik M. and Camm A. J. 1990. "Heart Rate Variability." *Clinical Cardiology* 13 (8): 570–76.



- Manaker S. and Verderame H. M. 1990. "Organization of Serotonin 1A and 1B Receptors in the Nucleus of the Solitary Tract." *The Journal of Comparative Neurology* 301 (4): 535–53.
- Manchanda R. K., Jaggi A. S. and Singh N. 2011. "Ameliorative Potential of Sodium Cromoglycate and Diethyldithiocarbamic Acid in Restraint Stress-Induced Behavioral Alterations in Rats." *Pharmacological Reports: PR* 63 (1): 54–63.
- Masaoka Y., Jack S., Warburton C. J. and Homma I. 2004. "Breathing Patterns Associated with Trait Anxiety and Breathlessness in Humans." *The Japanese Journal of Physiology* 54 (5): 465–70.
- Matsumura K., Averill D. B. and Ferrario C. M. 1998. "Angiotensin II Acts at AT1 Receptors in the Nucleus of the Solitary Tract to Attenuate the Baroreceptor Reflex." *The American Journal of Physiology* 275 (5 Pt 2): R1611–19.
- Matsumura K., Tsuchihashi T. and Abe I. 2001. "Central Orexin-A Augments Sympathoadrenal Outflow in Conscious Rabbits." *Hypertension* 37 (6): 1382–87.
- Mattace-Raso F. U. S., Van den Meiracker A. H., Bos W. J., Van der Cammen T. J. M., Westerhof B. E., Elias-Smale S., Reneman R. S., Hoeks A. P. G., Hofman A. and Witteman J. C. M. 2007. "Arterial Stiffness, Cardiovascular Baroreflex Sensitivity and Postural Blood Pressure Changes in Older Adults: The Rotterdam Study." *Journal of Hypertension* 25 (7): 1421–26.
- McAllen R. M. and Spyer K. M. 1978. "The Baroreceptor Input to Cardiac Vagal Motoneurons." *The Journal of Physiology* 282 (September): 365–74.
- McCrimmon D. R., Alheid G. F., Jiang M., Calandriello T. and Topgi A. 2004. "Converging Functional and Anatomical Evidence for Novel Brainstem Respiratory Compartments in the Rat." *Advances in Experimental Medicine and Biology* 551: 101–5.
- McDowall L. M., Horiuchi J., Killinger S. and Dampney R. A. L. 2006. "Modulation of the Baroreceptor Reflex by the Dorsomedial Hypothalamic Nucleus and Perifornical Area." *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 290 (4): R1020–26.
- McEwen B. S., Lambdin L. T., Rainbow T. C. and De Nicola A. F. 1986. "Aldosterone Effects on Salt Appetite in Adrenalectomized Rats." *Neuroendocrinology* 43 (1): 38–43.
- McFarlane A., Kamath M. V., Fallen E. L., Malcolm V., Cherian F. and Norman G. 2001. "Effect of Sertraline on the Recovery Rate of Cardiac Autonomic Function in Depressed Patients after Acute Myocardial Infarction." *American Heart Journal* 142 (4): 617–23.
- McKinley M. J., Albiston A. L., Allen A. M., Mathai M. L., May C. N., McAllen R. M., Oldfield B. J., Mendelsohn F. A. O. and Chai S. Y. 2003. "The Brain Renin–angiotensin System: Location and Physiological Roles." *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, Renin-Angiotensin Systems: State of the Art*, 35 (6): 901–18.
- McKinney W. T. and Bunney W. E. 1969. "Animal Model of Depression. I. Review of Evidence: Implications for Research." *Archives of General Psychiatry* 21 (2): 240–48.
- McKinnon M. C., Yucel K., Nazarov A. and MacQueen G. M. 2009. "A Meta-Analysis Examining Clinical Predictors of Hippocampal Volume in Patients with Major Depressive Disorder." *Journal of Psychiatry & Neuroscience: JPN* 34 (1): 41–54.

- Meaney M. J. 2001. "Maternal Care, Gene Expression, and the Transmission of Individual Differences in Stress Reactivity across Generations." *Annual Review of Neuroscience* 24: 1161–92.
- Mechan A. O., Moran P. M., Elliott M. J., Young A. J., Joseph M. H. and Green R. A. 2002. "A Comparison between Dark Agouti and Sprague-Dawley Rats in Their Behaviour on the Elevated plus-Maze, Open-Field Apparatus and Activity Meters, and Their Response to Diazepam." *Psychopharmacology* 159 (2): 188–95.
- Meeley M. P., Underwood M. D., Talman W. T. and Reis D. J. 1989. "Content and in Vitro Release of Endogenous Amino Acids in the Area of the Nucleus of the Solitary Tract of the Rat." *Journal of Neurochemistry* 53 (6): 1807–17.
- Mégarbane B. and Delahaye A. 2003. Syndrome sérotoninergique et intoxication par les antidépresseurs inhibiteurs de la recapture de la sérotonine (ISRS) et les antidépresseurs inhibiteurs de la monoamine oxydase (IMAO). Encyclopédie Orphanet.
- Mellman T. A., Knorr B. R., Pigeon W. R., Leiter J. C. and Akay M. 2004. "Heart Rate Variability during Sleep and the Early Development of Posttraumatic Stress Disorder." *Biological Psychiatry* 55 (9): 953–56.
- Merahi N. and Laguzzi R. 1995. "Cardiovascular Effects of 5HT<sub>2</sub> and 5HT<sub>3</sub> Receptor Stimulation in the Nucleus Tractus Solitarius of Spontaneously Hypertensive Rats." *Brain Research* 669 (1): 130–34.
- Merahi N., Orer H. S. and Laguzzi R. 1992. "5-HT<sub>2</sub> Receptors in the Nucleus Tractus Solitarius: Characterisation and Role in Cardiovascular Regulation in the Rat." *Brain Research* 575 (1): 74–78.
- Merahi N., Orer H. S., Laporte A. M., Gozlan H., Hamon M. and Laguzzi R. 1992. "Baroreceptor Reflex Inhibition Induced by the Stimulation of serotonin<sub>3</sub> Receptors in the Nucleus Tractus Solitarius of the Rat." *Neuroscience* 46 (1): 91–100.
- Merz C. J. and Wolf O. T. 2015. "Examination of Cortisol and State Anxiety at an Academic Setting with and without Oral Presentation." *Stress (Amsterdam, Netherlands)* 18 (1): 138–42.
- Michellini L. and Bonagamba L. 1990. "Angiotensin-II as a Modulator of Baroreceptor Reflexes in the Brain-Stem." *Hypertension* 15 (2): I45–50.
- Mifflin S. W., Spyer K. M. and Withington-Wray D. J. 1988. "Baroreceptor Inputs to the Nucleus Tractus Solitarius in the Cat: Postsynaptic Actions and the Influence of Respiration." *The Journal of Physiology* 399 (May): 349–67.
- Millan M. J. 2006. "Multi-Target Strategies for the Improved Treatment of Depressive States: Conceptual Foundations and Neuronal Substrates, Drug Discovery and Therapeutic Application." *Pharmacology & Therapeutics* 110 (2): 135–370.
- Minson J. B., Llewellyn-Smith I. J., Arnolda L. F., Pilowsky P. M. and Chalmers J. P. 1997. "C-Fos Expression in Central Neurons Mediating the Arterial Baroreceptor Reflex." *Clinical and Experimental Hypertension (New York, N.Y.: 1993)* 19 (5-6): 631–43.
- Minson J. B., Llewellyn-Smith I. J., Chalmers J. P., Pilowsky P. M. and Arnolda L. F. 1997. "C-Fos Identifies GABA-Synthesizing Barosensitive Neurons in Caudal Ventrolateral Medulla." *Neuroreport* 8 (14): 3015–21.



- Miura M. and Reis D. J. 1972. "The Role of the Solitary and Paramedian Reticular Nuclei in Mediating Cardiovascular Reflex Responses from Carotid Baro- and Chemoreceptors." *The Journal of Physiology* 223 (2): 525–48.
- Molkov Y. I., Abdala A. P. L., Bacak B. J., Smith J. C., Paton J. F. R. and Rybak I. A. 2010. "Late-Expiratory Activity: Emergence and Interactions With the Respiratory CPG." *Journal of Neurophysiology* 104 (5): 2713–29.
- Mongeau R., Martin C. B. P., Chevarin C., Maldonado R., Hamon M., Robledo P. and Lanfumey L. 2010. "5-HT<sub>2C</sub> Receptor Activation Prevents Stress-Induced Enhancement of Brain 5-HT Turnover and Extracellular Levels in the Mouse Brain: Modulation by Chronic Paroxetine Treatment." *Journal of Neurochemistry* 115 (2): 438–49.
- Montano N., Porta A., Cogliati C., Costantino G., Tobaldini E., Casali K. R. and Iellamo F. 2009. "Heart Rate Variability Explored in the Frequency Domain: A Tool to Investigate the Link between Heart and Behavior." *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, The Inevitable Link between Heart and Behavior: New Insights from Biomedical Research and Implications for Clinical Practice, 33 (2): 71–80.
- Morales M. and Wang S.-D. 2002. "Differential Composition of 5-hydroxytryptamine<sub>3</sub> Receptors Synthesized in the Rat CNS and Peripheral Nervous System." *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 22 (15): 6732–41. doi:20026612.
- Murphy D. J., Renninger J. P. and Coatney R. W. 2001. "A Novel Method for Chronic Measurement of Respiratory Function in the Conscious Monkey." *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* 46 (1): 13–20.
- Muscat R. and Willner P. 1992. "Suppression of Sucrose Drinking by Chronic Mild Unpredictable Stress: A Methodological Analysis." *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 16 (4): 507–17.
- Myers B., Dolgas C. M., Kasckow J., Cullinan W. E. and Herman J. P. 2014. "Central Stress-Integrative Circuits: Forebrain Glutamatergic and GABAergic Projections to the Dorsomedial Hypothalamus, Medial Preoptic Area, and Bed Nucleus of the Stria Terminalis." *Brain Structure & Function* 219 (4): 1287–1303.
- Nagae A., Fujita M., Kawarazaki H., Matsui H., Ando K. and Fujita T. 2009. "Sympathoexcitation by Oxidative Stress in the Brain Mediates Arterial Pressure Elevation in Obesity-Induced Hypertension." *Circulation* 119 (7): 978–86.
- Nakamura A., Zhang W., Yanagisawa M., Fukuda Y. and Kuwaki T. 2007. "Vigilance State-Dependent Attenuation of Hypercapnic Chemoreflex and Exaggerated Sleep Apnea in Orexin Knockout Mice." *Journal of Applied Physiology* 102 (1): 241–48.
- Nalivaiko E., Bondarenko E., Lidström A. and Barry R. J. 2011. "Respiratory Component of the Orienting Reflex: A Novel Sensitive Index of Sensory-Induced Arousal in Rats." *Frontiers in Physiology* 2: 114.
- N'Diaye A., Sévoz-Couche C., Nosjean A., Hamon M. and Laguzzi R. 2001. "Stimulation of 5-HT<sub>2</sub> Receptors in the Nucleus Tractus Solitarius Enhances NMDA Receptor-Mediated Reflex-Evoked Bradycardiac Responses in the Rat." *Autonomic Neuroscience: Basic & Clinical* 92 (1-2): 45–55.

- Neff R. A., Mihalevich M. and Mendelowitz D. 1998. "Stimulation of NTS Activates NMDA and Non-NMDA Receptors in Rat Cardiac Vagal Neurons in the Nucleus Ambiguus." *Brain Research* 792 (2): 277–82.
- Nesse R. M. 1999. "Proximate and Evolutionary Studies of Anxiety, Stress and Depression: Synergy at the Interface." *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 23 (7): 895–903.
- Nestler E. J., Gould E. and Manji H. 2002. "Preclinical Models: Status of Basic Research in Depression." *Biological Psychiatry*, NIMH Strategic Plan for Mood Disorders, 52 (6): 503–28.
- Netzer F., Mandjee N., Verberne A. J., Bernard J.-F., Hamon M., Laguzzi R. and Sévoz-Couche C. 2009. "Inhibition of the Bradycardic Component of the von Bezold-Jarisch Reflex and Carotid Chemoreceptor Reflex by Periaqueductal Gray Stimulation: Involvement of Medullary Receptors." *The European Journal of Neuroscience* 29 (10): 2017–28.
- Netzer F., Bernard J.-F., Verberne A. J. M., Hamon M., Camus F., Benoliel J.-J. and Sévoz-Couche C. 2011. "Brain Circuits Mediating Baroreflex Bradycardia Inhibition in Rats: An Anatomical and Functional Link between the Cuneiform Nucleus and the Periaqueductal Grey." *The Journal of Physiology* 589 (Pt 8): 2079–91.
- Nielsen A. M., Bisgard G. E. and Mitchell G. S. 1986. "Phrenic Nerve Responses to Hypoxia and CO<sub>2</sub> in Decerebrate Dogs." *Respiration Physiology* 65 (3): 267–83.
- Nishi M. and Kawata M. 2000. "Corticosteroid receptor and stress." *Nihon Shinkei Seishin Yakurigaku Zasshi = Japanese Journal of Psychopharmacology* 20 (5): 181–88.
- Norman R. A., Coleman T. G. and Dent A. C. 1981. "Continuous Monitoring of Arterial Pressure Indicates Sinoaortic Denervated Rats Are Not Hypertensive." *Hypertension* 3 (1): 119–25.
- Nosaka S. 1996. "Modifications of Arterial Baroreflexes: Obligatory Roles in Cardiovascular Regulation in Stress and Poststress Recovery." *The Japanese Journal of Physiology* 46 (4): 271–88.
- Nosaka S., Murata K., Inui K., and Murase S. 1993. "Arterial Baroreflex Inhibition by Midbrain Periaqueductal Grey in Anaesthetized Rats." *Pflügers Archiv: European Journal of Physiology* 424 (3-4): 266–75.
- Nosjean A., Arluison M. and Laguzzi R. F. 1987. "Increase in Paradoxical Sleep after Destruction of Serotonergic Innervation in the Nucleus Tractus Solitarius of the Rat." *Neuroscience* 23 (2): 469–81.
- Nosjean A., Compoint C., Buisseret-Delmas C., Orer H. S., Merahi N., Puizillout J. J. and Laguzzi R. 1990. "Serotonergic Projections from the Nodose Ganglia to the Nucleus Tractus Solitarius: An Immunohistochemical and Double Labeling Study in the Rat." *Neuroscience Letters* 114 (1): 22–26.
- Nosjean A., Franc B. and Laguzzi R. 1995. "Increased Sympathetic Nerve Discharge without Alteration in the Sympathetic Baroreflex Response by serotonin<sub>3</sub> Receptor Stimulation in the Nucleus Tractus Solitarius of the Rat." *Neuroscience Letters* 186 (1): 41–44.
- Nosjean A., Hamon M. and Laguzzi R. 1998. "C-Fos Induction in the Rostroventrolateral Medulla by 5-HT<sub>3</sub> Receptor Activation in the Nucleus Tractus Solitarius." *Neuroreport* 9 (3):

373–78.

Nunes F. C. and Braga V. A. 2011. “Chronic Angiotensin II Infusion Modulates Angiotensin II Type I Receptor Expression in the Subfornical Organ and the Rostral Ventrolateral Medulla in Hypertensive Rats.” *Journal of Renin-Angiotensin-Aldosterone System* 12 (4): 440–45.

Ohmura H., Hiraga A., Aida H., Kuwahara M. and Tsubone H. 2001. “Effects of Repeated Atropine Injection on Heart Rate Variability in Thoroughbred Horses.” *The Journal of Veterinary Medical Science / the Japanese Society of Veterinary Science* 63 (12): 1359–60.

Ohuoha D. C., Knable M. B., Wolf S. S., Kleinman J. E. and Hyde T. M. 1994. “The Subnuclear Distribution of 5-HT<sub>3</sub> Receptors in the Human Nucleus of the Solitary Tract and Other Structures of the Caudal Medulla.” *Brain Research* 637 (1-2): 222–26.

Okada Y., Galbreath M. M., Shibata S., Jarvis S. S., VanGundy T. B., Meier R. L., Vongpatanasin W., Levine B. D. and Fu Q. 2012. “relationship between sympathetic baroreflex sensitivity and arterial stiffness in elderly men and women.” *Hypertension* 59 (1): 98–104.

Olausson H., Cole J., Rylander K., McGlone F., Lamarre Y., Wallin B. G., Krämer H., et al. 2008. “Functional Role of Unmyelinated Tactile Afferents in Human Hairy Skin: Sympathetic Response and Perceptual Localization.” *Experimental Brain Research* 184 (1): 135–40.

Orer H. S., Merahi N., Nosjean A., Fattaccini C. M. and Laguzzi R. 1991. “Cardiovascular Effects of the Local Injection of 5,7-Dihydroxytryptamine into the Nodose Ganglia and Nucleus Tractus Solitarius in Awake Freely Moving Rats.” *Brain Research* 553 (1): 123–28.

Osanai S., Akiba Y., Fujiuchi S., Nakano H., Matsumoto H., Ohsaki Y. and Kikuchi K. 1999. “Depression of Peripheral Chemosensitivity by a Dopaminergic Mechanism in Patients with Obstructive Sleep Apnoea Syndrome.” *The European Respiratory Journal* 13 (2): 418–23.

Oshima N., McMullan S., Goodchild A. K. and Pilowsky P. M. 2006. “A Monosynaptic Connection between Baroinhibited Neurons in the RVLM and IML in Sprague-Dawley Rats.” *Brain Research* 1089 (1): 153–61.

Otake K., Sasaki H., Ezure K. and Manabe M. 1989. “Axonal Trajectory and Terminal Distribution of Inspiratory Neurons of the Dorsal Respiratory Group in the Cat’s Medulla.” *The Journal of Comparative Neurology* 286 (2): 218–30.

Otake K., Ezure K., Lipski J. and Wong She R. B. 1992. “Projections from the Commissural Subnucleus of the Nucleus of the Solitary Tract: An Anterograde Tracing Study in the Cat.” *The Journal of Comparative Neurology* 324 (3): 365–78.

Otu-Nyarko C. G., Gedalia A., Karpinski A. C., Kolomensky A. and Hyman P. E. 2015. “Disability in Children and Adolescents with Irritable Bowel Syndrome And/or Fibromyalgia.” *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, June.

Overstreet D. H. 2012. “Modeling Depression in Animal Models.” *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 829: 125–44. doi:10.1007/978-1-61779-458-2\_7.

Overstreet D. H. and G. Griebel. 2004. “Antidepressant-like Effects of CRF1 Receptor Antagonist SSR125543 in an Animal Model of Depression.” *European Journal of Pharmacology* 497 (1): 49–53.

- Overstreet D. H., Friedman E., Mathé A. A. and Yadid G. 2005. "The Flinders Sensitive Line Rat: A Selectively Bred Putative Animal Model of Depression." *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, Animal Models of Depression and Antidepressant Activity, 29 (4–5): 739–59.
- Padley J. R., Overstreet D. H., Pilowsky P. M. and Goodchild A. K. 2005. "Impaired Cardiac and Sympathetic Autonomic Control in Rats Differing in Acetylcholine Receptor Sensitivity." *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 289 (5): H1985–92.
- Pagani M., Lombardi F., Guzzetti S., Rimoldi O., Furlan R., Pizzinelli P., Sandrone G., Malfatto G., Dell'Orto S. and Piccaluga E. 1986. "Power Spectral Analysis of Heart Rate and Arterial Pressure Variabilities as a Marker of Sympatho-Vagal Interaction in Man and Conscious Dog." *Circulation Research* 59 (2): 178–93.
- Palkovits M. and Záborszky L.. 1977. "Neuroanatomy of Central Cardiovascular Control. Nucleus Tractus Solitarii: Afferent and Efferent Neuronal Connections in Relation to the Baroreceptor Reflex Arc." *Progress in Brain Research* 47: 9–34.
- Parati G., Ochoa J. E., Bilo G., Mattaliano P., Salvi P., Kario K., and Lombardi C. 2014. "Obstructive Sleep Apnea Syndrome as a Cause of Resistant Hypertension." *Hypertension Research: Official Journal of the Japanese Society of Hypertension* 37 (7): 601–13.
- Paré W. P. 1992a. "The Performance of WKY Rats on Three Tests of Emotional Behavior." *Physiology & Behavior* 51 (5): 1051–56.
- Paré WP. 1992b. "Learning Behavior, Escape Behavior, and Depression in an Ulcer Susceptible Rat Strain." *Integrative Physiological and Behavioral Science: The Official Journal of the Pavlovian Society* 27 (2): 130–41.
- Paré W. P. and Redei E. 1993. "Depressive Behavior and Stress Ulcer in Wistar Kyoto Rats." *Journal of Physiology, Paris* 87 (4): 229–38.
- Paré WP. 1994. "Open Field, Learned Helplessness, Conditioned Defensive Burying, and Forced-Swim Tests in WKY Rats." *Physiology & Behavior* 55 (3): 433–39.
- Paton J. F. and Kasparov S. 1999. "Differential Effects of Angiotensin II on Cardiorespiratory Reflexes Mediated by Nucleus Tractus Solitarii - a Microinjection Study in the Rat." *The Journal of Physiology* 521 Pt 1 (November): 213–25.
- Paton J. F., Deuchars J., Ahmad Z., Wong L. F., Murphy D. and Kasparov S. 2001. "Adenoviral Vector Demonstrates That Angiotensin II-Induced Depression of the Cardiac Baroreflex Is Mediated by Endothelial Nitric Oxide Synthase in the Nucleus Tractus Solitarii of the Rat." *The Journal of Physiology* 531 (Pt 2): 445–58.
- Pavlova I. V. and Rysakova M. P. 2013. "[Specific features of fear conditioning expression in active and passive rabbits]." *Rossiiskii Fiziologicheskii Zhurnal Imeni I.M. Sechenova / Rossiiskaia Akademiia Nauk* 99 (11): 1250–64.
- Pazos A., Cortés R. and Palacios J. M. 1985. "Quantitative Autoradiographic Mapping of Serotonin Receptors in the Rat Brain. II. Serotonin-2 Receptors." *Brain Research* 346 (2): 231–49.
- Peano C. A., Shonis C. A., Dillon G. H. and Waldrop T. G. 1992. "Hypothalamic GABAergic Mechanism Involved in Respiratory Response to Hypercapnia." *Brain Research Bulletin* 28

(1): 107–13.

Pearson K. A., Stephen A., Beck S. G. and Valentino R. J. 2006. “Identifying Genes in Monoamine Nuclei That May Determine Stress Vulnerability and Depressive Behavior in Wistar-Kyoto Rats.” *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 31 (11): 2449–61.

Penninx B. W., Beekman A. T., Honig A., Deeg D. J., Schoevers R. A., van Eijk J. T. and Van Tilburg W. 2001. “Depression and Cardiac Mortality: Results from a Community-Based Longitudinal Study.” *Archives of General Psychiatry* 58 (3): 221–27.

Perricone G., Fontana V., Burgio S. and Polizzi C. 2014. “Sibling Relationships as a Resource for Coping with Traumatic Events.” *SpringerPlus* 3: 525.

Persson P. B., Stauss H., Chung O., Wittmann U. and Unger T. 1992. “Spectrum Analysis of Sympathetic Nerve Activity and Blood Pressure in Conscious Rats.” *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 263 (5): H1348–55.

Peterson J. R., Sharma R. V. and Davisson R. L. 2006. “Reactive Oxygen Species in the Neuropathogenesis of Hypertension.” *Current Hypertension Reports* 8 (3): 232–41.

Phillips A. C., Hunt K., Der G. and Carroll D. 2011. “Blunted Cardiac Reactions to Acute Psychological Stress Predict Symptoms of Depression Five Years Later: Evidence from a Large Community Study.” *Psychophysiology* 48 (1): 142–48.

Pittenger C. and Duman R. S. 2007. “Stress, Depression, and Neuroplasticity: A Convergence of Mechanisms.” *Neuropsychopharmacology* 33 (1): 88–109.

Polson J. W., Dampney R. A. L., Boscan P., Pickering A. E. and Paton J. F. R. 2007. “Differential Baroreflex Control of Sympathetic Drive by Angiotensin II in the Nucleus Tractus Solitarius.” *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 293 (5): R1954–60.

Pomeranz B., Macaulay R. J., Caudill M. A., Kutz I., Adam D., Gordon D., Kilborn K. M., et al. 1985. “Assessment of Autonomic Function in Humans by Heart Rate Spectral Analysis.” *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 248 (1): H151–53.

Porges S. W. 1995. “Orienting in a Defensive World: Mammalian Modifications of Our Evolutionary Heritage. A Polyvagal Theory.” *Psychophysiology* 32 (4): 301–18.

Porsolt R. D., Bertin A. and Jalfre M. 1977. “Behavioral Despair in Mice: A Primary Screening Test for Antidepressants.” *Archives Internationales De Pharmacodynamie Et De Thérapie* 229 (2): 327–36.

Porter J. P., Phillips A., Rich J. and Wright D. 2004. “Effect of Chronic Stress on the Cardiac Baroreflex in the Post-Weanling Rat.” *Life Sciences* 75 (13): 1595–1607.

Pratt G. D. and Bowery N. G. 1989. “The 5-HT<sub>3</sub> Receptor Ligand, [3H]BRL 43694, Binds to Presynaptic Sites in the Nucleus Tractus Solitarius of the Rat.” *Neuropharmacology* 28 (12): 1367–76.

Pratt G. D., Bowery N. G., Kilpatrick G. J., Leslie R. A., Barnes N. M., Naylor R. J., Jones B. J., Nelson D. R., Palacios J. M. and Slater P. 1990. “Consensus Meeting Agrees Distribution of 5-HT<sub>3</sub> Receptors in Mammalian Hindbrain.” *Trends in Pharmacological Sciences* 11 (4):



135–37.

Qu L., McQueeney A. J. and Barnes K. L. 1996. “Presynaptic or Postsynaptic Location of Receptors for Angiotensin II and Substance P in the Medial Solitary Tract Nucleus.” *Journal of Neurophysiology* 75 (6): 2220–28.

Rabins P. V., Harvis K. and Koven S. 1985. “High Fatality Rates of Late-Life Depression Associated with Cardiovascular Disease.” *Journal of Affective Disorders* 9 (2): 165–67.

Radaelli A., Raco R., Perfetti P., Viola A., Azzellino A., Signorini M. G., and Ferrari A. U. 2004. “Effects of Slow, Controlled Breathing on Baroreceptor Control of Heart Rate and Blood Pressure in Healthy Men.” *Journal of Hypertension* 22 (7): 1361–70.

Raison C. L. and Miller A. H. 2003. “When Not Enough Is Too Much: The Role of Insufficient Glucocorticoid Signaling in the Pathophysiology of Stress-Related Disorders.” *American Journal of Psychiatry* 160 (9): 1554–65.

Ramage A. G. 2001. “Central Cardiovascular Regulation and 5-Hydroxytryptamine Receptors.” *Brain Research Bulletin* 56 (5): 425–39.

Ramanantsoa N., Hirsch M.-R., Thoby-Brisson M., Dubreuil V., Bouvier J., Ruffault P.-L., Matrot B., et al. 2011. “Breathing without CO<sub>2</sub> Chemosensitivity in Conditional Phox2b Mutants.” *The Journal of Neuroscience* 31 (36): 12880–88.

Raupach, T., Bahr F., Herrmann P., Luethje L., Heusser K., Hasenfuss G., Bernardi L. and Andreas S. 2008. “Slow Breathing Reduces Sympathoexcitation in COPD.” *The European Respiratory Journal* 32 (2): 387–92.

Ravenelle R., Santolucito H. B., Byrnes E. M., Byrnes J. J. and Donaldson S. T. 2014. “Housing Environment Modulates Physiological and Behavioral Responses to Anxiogenic Stimuli in Trait Anxiety Male Rats.” *Neuroscience* 270 (June): 76–87.

Rechlin T. 1994. “The Effect of Amitriptyline, Doxepin, Fluvoxamine, and Paroxetine Treatment on Heart Rate Variability.” *Journal of Clinical Psychopharmacology* 14 (6): 392–95.

Redei E., Paré W. P., Aird F. and Kluczynski J. 1994. “Strain Differences in Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Activity and Stress Ulcer.” *The American Journal of Physiology* 266 (2 Pt 2): R353–60.

Reis D. J., Granata A. R., Perrone M. H. and Talman W. T. 1981. “Evidence That Glutamic Acid Is the Neurotransmitter of Baroreceptor Afferent Terminating in the Nucleus Tractus Solitarius (NTS).” *Journal of the Autonomic Nervous System* 3 (2-4): 321–34.

Reis D. J., Ruggiero D. A., and Morrison S. F. 1989. “The C1 Area of Rostral Ventrolateral Medulla: A Central Site Integrating Autonomic Responses to Hemorrhage.” *Resuscitation* 18 (2-3): 269–88.

Rex A., Voigt J.-P., Gustedt C., Beckett S. and Fink H. 2004. “Anxiolytic-like Profile in Wistar, but Not Sprague-Dawley Rats in the Social Interaction Test.” *Psychopharmacology* 177 (1-2): 23–34.

Rittenhouse P. A., López-Rubalcava C., Stanwood G. D. and Lucki I. 2002. “Amplified Behavioral and Endocrine Responses to Forced Swim Stress in the Wistar-Kyoto Rat.”

*Psychoneuroendocrinology* 27 (3): 303–18.

Rivat C., Becker C., Blugeot A., Zeau B., Mauborgne A., Pohl M. and Benoliel J.-J. 2010. “Chronic Stress Induces Transient Spinal Neuroinflammation, Triggering Sensory Hypersensitivity and Long-Lasting Anxiety-Induced Hyperalgesia.” *Pain* 150 (2): 358–68.

Robbe H. W., Mulder L. J., Rüddel H., Langewitz W. A., Veldman J. B. and Mulder G. 1987. “Assessment of Baroreceptor Reflex Sensitivity by Means of Spectral Analysis.” *Hypertension* 10 (5): 538–43.

Roda F., Gestreau C. and Bianchi A. L. 2002. “Discharge Patterns of Hypoglossal Motoneurons during Fictive Breathing, Coughing, and Swallowing.” *Journal of Neurophysiology* 87 (4): 1703–11.

Rohde P. 2001. “The Relevance of Hierarchies, Territories, Defeat for Depression in Humans: Hypotheses and Clinical Predictions.” *Journal of Affective Disorders* 65 (3): 221–30.

Romyn G., Robey E., Dimmock J. A., Halson S. L. and Peeling P. 2015. “Sleep, Anxiety and Electronic Device Use by Athletes in the Training and Competition Environments.” *European Journal of Sport Science*, March, 1–8.

Ross C. A., Ruggiero D. A. and Reis D. J. 1985. “Projections from the Nucleus Tractus Solitarii to the Rostral Ventrolateral Medulla.” *The Journal of Comparative Neurology* 242 (4): 511–34.

Roth K. A. and Katz R. J. 1981. “Further Studies on a Novel Animal Model of Depression: Therapeutic Effects of a Tricyclic Antidepressant.” *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 5 (2): 253–58.

Routier A. 1991. Le stress, Rappel du concept. *Archives de Maladies Professionnelles*. 52:254

Roux J. C., Pequignot J. M., Dumas S., Pascual O., Ghilini G., Pequignot J., Mallet J. and Denavit-Saubié M. 2000. “O<sub>2</sub>-Sensing after Carotid Chemodenervation: Hypoxic Ventilatory Responsiveness and Upregulation of Tyrosine Hydroxylase mRNA in Brainstem Catecholaminergic Cells.” *The European Journal of Neuroscience* 12 (9): 3181–90.

Roy-Byrne P. P., Craske M. G. and Stein M. B. 2006. “Panic Disorder.” *Lancet* 368 (9540): 1023–32.

Rush A. J., Giles D. E., Schlessner M. A., Orsulak P. J., Parker C. R., Weissenburger J. E., Crowley G. T., Khatami M. and Vasavada N. 1996. “The Dexamethasone Suppression Test in Patients with Mood Disorders.” *The Journal of Clinical Psychiatry* 57 (10): 470–84.

Rutten S., Ghielen I., Vriend C., Hoogendoorn A. W., Berendse H. W., Leentjens A. F. G., Van der Werf Y. D., Smit J. H. and Van den Heuvel O. A. 2015. “Anxiety in Parkinson’s Disease: Symptom Dimensions and Overlap with Depression and Autonomic Failure.” *Parkinsonism & Related Disorders* 21 (3): 189–93.

Saavedra J. M., Correa F. M., Kurihara M. and Shigematsu K. 1986. “Increased Number of Angiotensin II Receptors in the Subfornical Organ of Spontaneously Hypertensive Rats.” *Journal of Hypertension. Supplement: Official Journal of the International Society of Hypertension* 4 (5): S27–30.

Sakurai T., Amemiya A., Ishii M., Matsuzaki I., Chemelli R. M., Tanaka H., Williams S. C.,



et al. 1998. "Orexins and Orexin Receptors: A Family of Hypothalamic Neuropeptides and G Protein-Coupled Receptors That Regulate Feeding Behavior." *Cell* 92 (4): 573–85.

Sandi C. and Touyarot K. 2006. "Mid-Life Stress and Cognitive Deficits during Early Aging in Rats: Individual Differences and Hippocampal Correlates." *Neurobiology of Aging* 27 (1): 128–40.

Santarelli L., Gobbi G., Debs P. C., Sibille E. T., Blier P., Hen R. and Heath M. J. 2001. "Genetic and Pharmacological Disruption of Neurokinin 1 Receptor Function Decreases Anxiety-Related Behaviors and Increases Serotonergic Function." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 (4): 1912–17.

Santarelli L., Saxe M., Gross C., Surget A., Battaglia F., Dulawa S., Weisstaub N., et al. 2003. "Requirement of Hippocampal Neurogenesis for the Behavioral Effects of Antidepressants." *Science (New York, N.Y.)* 301 (5634): 805–9.

Sapolsky R. M. and Eichenbaum H. 1980. "Thalamocortical Mechanisms in Odor-Guided Behavior. II. Effects of Lesions of the Mediodorsal Thalamic Nucleus and Frontal Cortex on Odor Preferences and Sexual Behavior in the Hamster." *Brain, Behavior and Evolution* 17 (4): 276–90.

Schaffar N., Kessler J. P., Bosler O. and Jean A. 1988. "Central Serotonergic Projections to the Nucleus Tractus Solitarii: Evidence from a Double Labeling Study in the Rat." *Neuroscience* 26 (3): 951–58.

Schinke M., Baltatu O., Böhm M., Peters J., Rascher W., Bricca G., Lippoldt A., Ganten D. and Bader M. 1999. "Blood Pressure Reduction and Diabetes Insipidus in Transgenic Rats Deficient in Brain Angiotensinogen." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 (7): 3975–80.

Schleifer S. J., Macari-Hinson M. M., Coyle D. A., Slater W. R., Kahn M., Gorlin R. and Zucker H. D. 1989. "The Nature and Course of Depression Following Myocardial Infarction." *Archives of Internal Medicine* 149 (8): 1785–89.

Schmidt M. V., Sterlemann V. and Müller M. B. 2008. "Chronic Stress and Individual Vulnerability." *Annals of the New York Academy of Sciences* 1148 (December): 174–83.

Schmidt T. J. and Meyer A. S.. 1994. "Autoregulation of Corticosteroid Receptors. How, When, Where, and Why?" *Receptor* 4 (4): 229–57.

Schroeder C., Tank J., Boschmann M., Diedrich A., Sharma A. M., Biaggioni I., Luft F. C., and Jordan J. 2002. "Selective Norepinephrine Reuptake Inhibition as a Human Model of Orthostatic Intolerance." *Circulation* 105 (3): 347–53.

Schweizer M. C., Henniger M. S. H. and Sillaber I. 2009. "Chronic Mild Stress (CMS) in Mice: Of Anhedonia, 'Anomalous Anxiolysis' and Activity." *PloS One* 4 (1): e4326.

Sechter D. 1995. "[Long-term clinical effects of antidepressive agents]." *L'Encéphale* 21 Spec No 2 (March): 35–38.

Selye H. 1936. A syndrome produced by diverse noxious agents. *Nature* 32:138-139,

Selye H. 1950. The physiology and pathology of exposure to stress: a treatise on the concepts of the general-adaptation-syndrome and the diseases of adaptation. Acta. Inc. Medical,

Senanayake P. D., Moriguchi A., Kumagai H., Ganten D., Ferrario C. M. and Brosnihan KB. 1994. "Increased expression of angiotensin peptides in the brain of transgenic hypertensive rats." *Peptides* 15(5):919-26.

Sesay M., Robin G., Tauzin-Fin P., Sacko O., Gimbert E., Vignes J.-R., Liguoro D. and Nouette-Gaulain K. 2015. "Responses of Heart Rate Variability to Acute Pain after Minor Spinal Surgery: Optimal Thresholds and Correlation with the Numeric Rating Scale." *Journal of Neurosurgical Anesthesiology* 27 (2): 148–54.

Seta K. A., Spicer Z., Yuan Y., Lu G. and Millhorn D. E. 2002. "Responding to Hypoxia: Lessons From a Model Cell Line." *Science Signaling* 2002 (146): re11–re11.

Severs W. B. and Daniels-Severs A. E. 1973. "Effects of Angiotensin on the Central Nervous System." *Pharmacological Reviews* 25 (3): 415–49.

Sévoz C., Hamon M. and Laguzzi R. 1996. "Medullary Pathways of Cardiovascular Responses to 5-HT<sub>2</sub> and 5-HT<sub>3</sub> Receptor Stimulation in the Rat Nucleus Tractus Solitarius." *Neuroreport* 7 (12): 1965–69.

Sévoz C., Nosjean A., Callera J. C., Machado B., Hamon M. and Laguzzi R. 1996. "Stimulation of 5-HT<sub>3</sub> Receptors in the NTS Inhibits the Cardiac Bezold-Jarisch Reflex Response." *The American Journal of Physiology* 271 (1 Pt 2): H80–87.

Sévoz C., Callera J. C., Machado B. H., Hamon M. and Laguzzi R. 1997. "Role of serotonin<sub>3</sub> Receptors in the Nucleus Tractus Solitarii on the Carotid Chemoreflex." *The American Journal of Physiology* 272 (3 Pt 2): H1250–59.

Sévoz-Couche C., Nosjean A., Franc B., Hamon M. and Laguzzi R. 1998. "Dorsal Medullary 5-HT<sub>3</sub> Receptors and Sympathetic Premotor Neurones in the Rat." *The Journal of Physiology* 508 ( Pt 3) (May): 747–62.

Sévoz-Couche C., Spyer K. M. and Jordan D. 2000a. "Inhibition of Rat Nucleus Tractus Solitarius Neurones by Activation of 5-HT<sub>2C</sub> Receptors." *Neuroreport* 11 (8): 1785–90.

Sévoz-Couche C., Spyer K. M. and Jordan D. 2000b. "In Vivo Modulation of Vagal-Identified Dorsal Medullary Neurones by Activation of Different 5-Hydroxytryptamine(2) Receptors in Rats." *British Journal of Pharmacology* 131 (7): 1445–53.

Sévoz-Couche C., Maisonneuve B., Hamon M. and Laguzzi R. 2002. "Glutamate and NO Mediation of the Pressor Response to 5-HT<sub>3</sub> Receptor Stimulation in the Nucleus Tractus Solitarii." *Neuroreport* 13 (6): 837–41.

Sévoz-Couche C., Comet M.-A., Hamon M. and Laguzzi R. 2003. "Role of Nucleus Tractus Solitarius 5-HT<sub>3</sub> Receptors in the Defense Reaction-Induced Inhibition of the Aortic Baroreflex in Rats." *Journal of Neurophysiology* 90 (4): 2521–30.

Sévoz-Couche C., Brouillard C., Camus F., Laude D., De Boer S. F., Becker C., and Benoliel J.-J. 2013. "Involvement of the Dorsomedial Hypothalamus and the Nucleus Tractus Solitarii in Chronic Cardiovascular Changes Associated with Anxiety in Rats." *The Journal of Physiology* 591 (Pt 7): 1871–87.

Sgoifo A., Stilli D., Medici D., Gallo P., Aimi B. and Musso E. 1996. "Electrode Positioning for Reliable Telemetry ECG Recordings during Social Stress in Unrestrained Rats." *Physiology & Behavior* 60 (6): 1397–1401.

Sgoifo A., Pozzato C., Meerlo P., Costoli T., Manghi M., Stilli D., Olivetti G. and Musso E. 2002. "Intermittent Exposure to Social Defeat and Open-Field Test in Rats: Acute and Long-Term Effects on ECG, Body Temperature and Physical Activity." *Stress (Amsterdam, Netherlands)* 5 (1): 23–35.

Shaffer F., McCraty R. and Zerr C. L. 2014. "A Healthy Heart Is Not a Metronome: An Integrative Review of the Heart's Anatomy and Heart Rate Variability." *Frontiers in Psychology* 5 (September).

Shahid I. Z., Rahman A. A. and Pilowsky P. M. 2012. "Orexin A in Rat Rostral Ventrolateral Medulla Is Pressor, Sympatho-Excitatory, Increases Barosensitivity and Attenuates the Somato-Sympathetic Reflex." *British Journal of Pharmacology* 165 (7): 2292–2303.

Sharma M., Frishman W. H. and Gandhi K. 2011. "RESPeRATE: Nonpharmacological Treatment of Hypertension." *Cardiology in Review* 19 (2): 47–51.

Shibasaki M., Umemoto Y., Kinoshita T., Kouda K., Ito T., Nakamura T., Crandall C. G. and Tajima F. 2015. "The Role of Cardiac Sympathetic Innervation and Skin Thermoreceptors on Cardiac Responses during Heat Stress." *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 308 (11): H1336–42.

Shirasaka T., Nakazato M., Matsukura S., Takasaki M. and Kannan H. 1999. "Sympathetic and Cardiovascular Actions of Orexins in Conscious Rats." *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 277 (6): R1780–85.

Siché J. P., Tremel F., Comparat V., De Gaudemaris R. and Mallion J. M. 1995. "Examination of Variability in Arterial Blood Pressure at Rest Using Spectral Analysis in Hypertensive Patients." *Journal of Hypertension* 13 (1): 147–53.

Siegmund A. and Wotjak C. T. 2007. "Hyperarousal Does Not Depend on Trauma-Related Contextual Memory in an Animal Model of Posttraumatic Stress Disorder." *Physiology & Behavior* 90 (1): 103–7.

Simpson J. B. 1981. "The Circumventricular Organs and the Central Actions of Angiotensin." *Neuroendocrinology* 32 (4): 248–56.

Skinner M. R., Ramage A. G., and Jordan D. 2002. "Modulation of Reflexly Evoked Vagal Bradycardias by Central 5-HT<sub>1A</sub> Receptors in Anaesthetized Rabbits." *British Journal of Pharmacology* 137 (6): 861–73.

Šlamberová R., Mikulecká A., Macúchová E., Hřebíčková I., Ševčíková M., Nohejlová K. and Pometlová M. 2015. "Effects of Psychostimulants on Social Interaction in Adult Male Rats." *Behavioural Pharmacology*, June.

Smoller J. W., Pollack M. H., Otto M. W., Rosenbaum J. F. and Kradin R. L. 1996. "Panic Anxiety, Dyspnea, and Respiratory Disease. Theoretical and Clinical Considerations." *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 154 (1): 6–17.

Somogyi P., Minson J. B., Morilak D., Llewellyn-Smith I., McIlhinney J. R. A. and Chalmers J. 1989. "Evidence for an Excitatory Amino Acid Pathway in the Brainstem and for Its Involvement in Cardiovascular Control." *Brain Research* 496 (1–2): 401–7.

Song G., Xu H., Wang H., Macdonald S. M. and Poon C.-S. 2011. "Hypoxia-Excited Neurons in NTS Send Axonal Projections to Kölliker-Fuse/parabrachial Complex in Dorsolateral

Pons.” *Neuroscience* 175 (February): 145–53.

Song N., Zhang G., Geng W., Liu Z., Jin W., Li L., Cao Y., Zhu D., Yu J. and Shen L. 2012. “Acid Sensing Ion Channel 1 in Lateral Hypothalamus Contributes to Breathing Control.” *PloS One* 7 (7): e39982.

Speth R. C., Dinh T. T. and Ritter S. 1987. “Nodose Ganglionectomy Reduces Angiotensin II Receptor Binding in the Rat Brainstem.” *Peptides* 8 (4): 677–85.

Sproule B. A., Naranjo C. A., Brenner K. E., and Hassan P. C. 1997. “Selective Serotonin Reuptake Inhibitors and CNS Drug Interactions. A Critical Review of the Evidence.” *Clinical Pharmacokinetics* 33 (6): 454–71.

Spyer K M. 1994. “Annual Review Prize Lecture. Central Nervous Mechanisms Contributing to Cardiovascular Control.” *The Journal of Physiology* 474 (1): 1–19.

Srinivasan V., De Berardis D., Shillcutt S. D. and Brzezinski A. 2012. “Role of Melatonin in Mood Disorders and the Antidepressant Effects of Agomelatine.” *Expert Opinion on Investigational Drugs* 21 (10): 1503–22.

Stedenfeld K. A., Clinton S. M., Kerman I. A., Akil H., Watson S. J., and Sved A. F. 2011. “Novelty-Seeking Behavior Predicts Vulnerability in a Rodent Model of Depression.” *Physiology & Behavior* 103 (2): 210–16. doi:10.1016/j.physbeh.2011.02.001.

Steinbusch H. W., Verhofstad A. A., Penke B., Varga J. and Joosten H. W. 1981. “Immunohistochemical Characterization of Monoamine-Containing Neurons in the Central Nervous System by Antibodies to Serotonin and Noradrenalin. A Study in the Rat and the Lamprey (*Lampetra fluviatilis*).” *Acta Histochemica. Supplementband* 24: 107–22.

Stornetta R. L., Hawelu-Johnson C. L., Guyenet P. G. and Lynch K. R. 1988. “Astrocytes Synthesize Angiotensinogen in Brain.” *Science (New York, N.Y.)* 242 (4884): 1444–46.

Stotz-Potter E. H., Morin S. M. and DiMicco J. A. 1996. “Effect of Microinjection of Muscimol into the Dorsomedial or Paraventricular Hypothalamic Nucleus on Air Stress-Induced Neuroendocrine and Cardiovascular Changes in Rats.” *Brain Research* 742 (1-2): 219–24.

Stranahan A. M., Khalil D., and Gould E. 2006. “Social Isolation Delays the Positive Effects of Running on Adult Neurogenesis.” *Nature Neuroscience* 9 (4): 526–33.

Strekalova T., Spanagel R., Bartsch D., Henn F. A. and Gass P. 2004. “Stress-Induced Anhedonia in Mice Is Associated with Deficits in Forced Swimming and Exploration.” *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 29 (11): 2007–17.

Subramanian H. H. and Holstege G. 2009. “The Nucleus Retroambiguus Control of Respiration.” *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 29 (12): 3824–32. doi:10.1523/JNEUROSCI.0607-09.2009.

Suemaru S., Darlington D. N., Akana S. F., Cascio C. S. and Dallman M. F. 1995. “Ventromedial Hypothalamic Lesions Inhibit Corticosteroid Feedback Regulation of Basal ACTH during the Trough of the Circadian Rhythm.” *Neuroendocrinology* 61 (4): 453–63.

Sumners C., Zhu M., Gelband C. H. and Posner P. 1996. “Angiotensin II Type 1 Receptor

- Modulation of Neuronal K<sup>+</sup> and Ca<sup>2+</sup> Currents: Intracellular Mechanisms." *American Journal of Physiology - Cell Physiology* 271 (1): C154–63.
- Sundlöf G. and Wallin B. G. 1978. "Human Muscle Nerve Sympathetic Activity at Rest. Relationship to Blood Pressure and Age." *The Journal of Physiology* 274 (January): 621–37.
- Sunter D., Morgan I., Edwards C. M. B., Dakin C. L., Murphy K. G., Gardiner J., Taheri S., Rayes E. and Bloom S. R. 2001. "Orexins: Effects on Behavior and Localisation of Orexin Receptor 2 Messenger Ribonucleic Acid in the Rat Brainstem." *Brain Research* 907 (1–2): 27–34.
- Svensson T. H. 2000. "Brain Noradrenaline and the Mechanisms of Action of Antidepressant Drugs." *Acta Psychiatrica Scandinavica. Supplementum* 402: 18–27.
- Syme L. A. 1973. "Spurious Species Comparisons in Housing Studies Using Laboratory Rats and Mice." *Psychological Reports* 33 (2): 507–10.
- Szapacs M. E., Mathews T. A., Tessarollo L., Lyons W. E., Mamounas L. A. and Andrews A. M. 2004. "Exploring the Relationship between Serotonin and Brain-Derived Neurotrophic Factor: Analysis of BDNF Protein and Extraneuronal 5-HT in Mice with Reduced Serotonin Transporter or BDNF Expression." *Journal of Neuroscience Methods* 140 (1–2): 81–92.
- Szigethy E. M., Barnes K. L. and Diz D. I. 1992. "Light Microscopic Localization of Angiotensin II Binding Sites in Canine Medulla Using High Resolution Autoradiography." *Brain Research Bulletin* 29 (6): 813–19.
- Tafil-Klawe M., Thiele A. E., Raschke F., Mayer J., Peter J. H. and Von Wichert W. 1991. "Peripheral Chemoreceptor Reflex in Obstructive Sleep Apnea Patients; a Relationship between Ventilatory Response to Hypoxia and Nocturnal Bradycardia during Apnea Events." *Pneumologie (Stuttgart, Germany)* 45 Suppl 1 (May): 309–11.
- Tagawa T. and Dampney R. A. L. 1999. "AT<sub>1</sub> Receptors Mediate Excitatory Inputs to Rostral Ventrolateral Medulla Pressor Neurons From Hypothalamus." *Hypertension* 34 (6): 1301–7.
- Taha B. H., Simon P. M., Dempsey J. A., Skatrud J. B. and Iber C. 1995. "Respiratory Sinus Arrhythmia in Humans: An Obligatory Role for Vagal Feedback from the Lungs." *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)* 78 (2): 638–45.
- Takahashi N., Okumura T., Yamada H. and Kohgo Y. 1999. "Stimulation of Gastric Acid Secretion by Centrally Administered Orexin-A in Conscious Rats." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 254 (3): 623–27.
- Takakura A. C. T., Santos Moreira T., Colombari E., West G. H., Stornetta R. L. and Guyenet P. G. 2006. "Peripheral Chemoreceptor Inputs to Retrotrapezoid Nucleus (RTN) CO<sub>2</sub>-Sensitive Neurons in Rats." *The Journal of Physiology* 572 (Pt 2): 503–23.
- Talman W. T., Granata A. R. and Reis D. J. 1984. "Glutamatergic Mechanisms in the Nucleus Tractus Solitarius in Blood Pressure Control." *Federation Proceedings* 43 (1): 39–44.
- Talman W. T., Perrone M. H., Scher P., Kwo S. and Reis D. J. 1981. "Antagonism of the Baroreceptor Reflex by Glutamate Diethyl Ester, an Antagonist to L-Glutamate." *Brain Research* 217 (1): 186–91.
- Tan P. S. P., Killinger S., Horiuchi J. and Dampney R. A. L. 2007. "Baroreceptor Reflex



Modulation by Circulating Angiotensin II Is Mediated by AT1 Receptors in the Nucleus Tractus Solitarius.” *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 293 (6): R2267–78.

Tempel D. L. and Leibowitz S. F. 1994. “Adrenal Steroid Receptors: Interactions with Brain Neuropeptide Systems in Relation to Nutrient Intake and Metabolism.” *Journal of Neuroendocrinology* 6 (5): 479–501.

Teppema L. J., Berkenbosch A., Veening J. G. and Olievier C. N. 1994. “Hypercapnia Induces c-Fos Expression in Neurons of Retrotrapezoid Nucleus in Cats.” *Brain Research* 635 (1–2): 353–56.

Teruya H., Muratani H., Takishita S., Sesoko S., Matayoshi R. and Fukiyama K. 1995. " Brain angiotensin II contributes to the development of hypertension in Dahl-Iwai salt-sensitive rats." *J Hypertens.* 13(8):883-90.

Thanos P. K., Roushdy K., Sarwar Z., Rice O., Ashby C. R. and Grandy D. K. 2015. “The Effect of Dopamine D4 Receptor Density on Novelty Seeking, Activity, Social Interaction, and Alcohol Binge Drinking in Adult Mice.” *Synapse (New York, N.Y.)* 69 (7): 356–64. d

Thayer J. F. and Lane R. D.. 2000. “A Model of Neurovisceral Integration in Emotion Regulation and Dysregulation.” *Journal of Affective Disorders, Arousal in Anxiety*, 61 (3): 201–16.

Thireau J., Karam S., Roberge S., Roussel J., Aimond F., Cassan C., Gac A., et al. 2014. “B-Adrenergic Blockade Combined with Subcutaneous B-Type Natriuretic Peptide: A Promising Approach to Reduce Ventricular Arrhythmia in Heart Failure?” *Heart (British Cardiac Society)* 100 (11): 833–41.

Thor K. B. and Helke C. J. 1987. “Serotonin- and Substance P-Containing Projections to the Nucleus Tractus Solitarii of the Rat.” *The Journal of Comparative Neurology* 265 (2): 275–93.

Tolentino-Silva F. P., Haxhiu M. A., Ernsberger P., Waldbaum S., and Dreshaj I. A. 2000. “Differential Cardiorespiratory Control Elicited by Activation of Ventral Medullary Sites in Mice.” *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)* 89 (2): 437–44.

Tomori Z., Benacka R. and Donic V. 1998. “Mechanisms and Clinicophysiological Implications of the Sniff- and Gasp-like Aspiration Reflex.” *Respiration Physiology* 114 (1): 83–98.

Torre-Bouscoulet L., Castorena-Maldonado A., Sada-Ovalle I. and Meza-Vargas M. S. 2008. “[Mechanisms of cardiovascular damage in obstructive sleep apnea].” *Revista De Investigación Clínica; Organo Del Hospital De Enfermedades De La Nutrición* 60 (6): 502–16.

Treit D., Pinel J. P. and Fibiger H. C. 1981. “Conditioned Defensive Burying: A New Paradigm for the Study of Anxiolytic Agents.” *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior* 15 (4): 619–26.

Trombini M., Hulshof H. J., Graiani G., Carnevali L., Meerlo P., Quaini F. and Sgoifo A. 2012. “Early Maternal Separation Has Mild Effects on Cardiac Autonomic Balance and Heart Structure in Adult Male Rats.” *Stress (Amsterdam, Netherlands)* 15 (4): 457–70.

Tsai C.-Y., Su C.-H., Baudrie V., Laude D., Weng J.-C., Chang A. Y. W., Chan J. Y. H., Elghozi J.-L. and Chan S. H. H. 2013. "Visualizing Oxidative Stress-Induced Depression of Cardiac Vagal Baroreflex by MRI/DTI in a Mouse Neurogenic Hypertension Model." *NeuroImage* 82 (November): 190–99.

Tsankova N. M., Berton O., Renthal W., Kumar A., Neve R. L. and Nestler E. J. 2006. "Sustained Hippocampal Chromatin Regulation in a Mouse Model of Depression and Antidepressant Action." *Nature Neuroscience* 9 (4): 519–25.

Tsuji H., Larson M. G., Venditti F. J., Manders E. S., Evans J. C., Feldman C. L. and Levy D. 1996. "Impact of Reduced Heart Rate Variability on Risk for Cardiac Events. The Framingham Heart Study." *Circulation* 94 (11): 2850–55.

Tsukamoto K., Kurihara T., Nakayama N., Isogai O., Ito S., Komatsu K. and Kanmatsuse K. 2000. "Pressor Responses to Serotonin Injected into the Nucleus Tractus Solitarius of Sprague-Dawley Rats and Spontaneously Hypertensive Rats." *Clinical and Experimental Hypertension (New York, N.Y.: 1993)* 22 (1): 63–73.

Tulen J. H., Bruijn J. A., De Man K. J., Pepplinkhuizen L., Van den Meiracker A. H. and Man in 't Veld A. J. 1996. "Cardiovascular Variability in Major Depressive Disorder and Effects of Imipramine or Mirtazapine (Org 3770)." *Journal of Clinical Psychopharmacology* 16 (2): 135–45.

Tulppo M. P., Mäkikallio T. H., Seppänen T., Airaksinen J. K. and Huikuri H. V. 1998. "Heart Rate Dynamics during Accentuated Sympathovagal Interaction." *The American Journal of Physiology* 274 (3 Pt 2): H810–16.

Tuma J., Kolinko Y., Vozeh F. and Cendelin J. 2015. "Mutation-Related Differences in Exploratory, Spatial, and Depressive-like Behavior in Pcd and Lurcher Cerebellar Mutant Mice." *Frontiers in Behavioral Neuroscience* 9: 116. doi:10.3389/fnbeh.2015.00116.

Urzedo-Rodrigues L. S., Ferreira H. S., Almeida D. O., Medeiros J. P., Batista A., De Castro e Silva E. and Fregoneze J. B. 2011. "Blockade of 5-HT<sub>3</sub> Receptors at Septal Area Increase Blood Pressure in Unanaesthetized Rats." *Autonomic Neuroscience: Basic & Clinical* 159 (1-2): 51–61.

Van den Hove D. L. A., Blanco C. E., Aendekerk B., Desbonnet L., Bruschetti M., Steinbusch H. P., Prickaerts J. and Steinbusch H. W. M. 2005. "Prenatal Restraint Stress and Long-Term Affective Consequences." *Developmental Neuroscience* 27 (5): 313–20. doi:10.1159/000086711.

Vaz G. C., Bahia A. P. C. O., De Figueiredo Müller-Ribeiro F. C., Xavier C. H., Patel K. P., Santos R. A. S., Moreira F. A., Frézard F. and Fontes M. A. P. 2015. "Cardiovascular and Behavioral Effects Produced by Administration of Liposome-Entrapped GABA into the Rat Central Nervous System." *Neuroscience* 285 (January): 60–69.

Verberne A. J. and Guyenet P. G. 1992. "Midbrain Central Gray: Influence on Medullary Sympathoexcitatory Neurons and the Baroreflex in Rats." *The American Journal of Physiology* 263 (1 Pt 2): R24–33.

Videbech P., and Ravnkilde B. 2004. "Hippocampal Volume and Depression: A Meta-Analysis of MRI Studies." *The American Journal of Psychiatry* 161 (11): 1957–66.

Virtanen R., Jula A., Salminen J. K., Voipio-Pulkki L.-M., Helenius H., Kuusela T. and



- Airaksinen J. 2003. "Anxiety and Hostility Are Associated with Reduced Baroreflex Sensitivity and Increased Beat-to-Beat Blood Pressure Variability." *Psychosomatic Medicine* 65 (5): 751–56.
- Von Euler C., Marttila I., Remmers J. E. and Trippenbach T. 1976. "Effects of Lesions in the Parabrachial Nucleus on the Mechanisms for Central and Reflex Termination of Inspiration in the Cat." *Acta Physiologica Scandinavica* 96 (3): 324–37.
- Vyas A., Mitra R., Rao B. S. S. and Chattarji S. 2002. "Chronic Stress Induces Contrasting Patterns of Dendritic Remodeling in Hippocampal and Amygdaloid Neurons." *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 22 (15): 6810–18. doi:20026655.
- Waki H., Kasparov S., Wong L.-F., Murphy D., Shimizu T. and Paton J. F. R. 2003. "Chronic Inhibition of Endothelial Nitric Oxide Synthase Activity in Nucleus Tractus Solitarius Enhances Baroreceptor Reflex in Conscious Rats." *The Journal of Physiology* 546 (Pt 1): 233–42.
- Waldrop T. G. 1991. "Posterior Hypothalamic Modulation of the Respiratory Response to CO<sub>2</sub> in Cats." *Pflügers Archiv: European Journal of Physiology* 418 (1-2): 7–13.
- Wallace A., Pehrson A. L., Sánchez C. and Morilak D. A. 2014. "Vortioxetine Restores Reversal Learning Impaired by 5-HT Depletion or Chronic Intermittent Cold Stress in Rats." *The International Journal of Neuropsychopharmacology / Official Scientific Journal of the Collegium Internationale Neuropsychopharmacologicum (CINP)* 17 (10): 1695–1706.
- Wang D., Noda Y., Tsunekawa H., Zhou Y., Miyazaki M., Senzaki K. and Nabeshima T. 2007. "Behavioural and Neurochemical Features of Olfactory Bulbectomized Rats Resembling Depression with Comorbid Anxiety." *Behavioural Brain Research* 178 (2): 262–73. doi:10.1016/j.bbr.2007.01.003.
- Wang R., Koganezawa T. and Terui N. 2010. "Differential Responses of Sympathetic Premotor Neurons in the Rostral Ventrolateral Medulla to Stimulation of the Dorsomedial Hypothalamus in Rabbits." *Brain Research* 1356 (October): 44–53.
- Wang S., Benamer N., Zanella S., Kumar N. N., Shi Y., Bévençut M., Penton D., et al. 2013. "TASK-2 Channels Contribute to pH Sensitivity of Retrotrapezoid Nucleus Chemoreceptor Neurons." *The Journal of Neuroscience* 33 (41): 16033–44.
- Wang W.-Z., Gao L., Pan Y.-X., Zucker I. H. and Wang W. 2007. "AT<sub>1</sub> Receptors in the Nucleus Tractus Solitarius Mediate the Interaction between the Baroreflex and the Cardiac Sympathetic Afferent Reflex in Anesthetized Rats." *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 292 (3): R1137–45.
- Wang Y., Ma Y., Hu J., Cheng W., Jiang H., Zhang X., Li M., Ren J. and Li X. 2015. "Prenatal Chronic Mild Stress Induces Depression-like Behavior and Sex-Specific Changes in Regional Glutamate Receptor Expression Patterns in Adult Rats." *Neuroscience*, June.
- Watkins L. L., Grossman P., Krishnan R. and Blumenthal J. A. 1999. "Anxiety Reduces Baroreflex Cardiac Control in Older Adults with Major Depression." *Psychosomatic Medicine* 61 (3): 334–40.
- Watkins L. L., Grossman P., Krishnan R. and Sherwood A. 1998. "Anxiety and Vagal Control of Heart Rate." *Psychosomatic Medicine* 60 (4): 498–502.

- Weinstock M. 2011. "Sex-Dependent Changes Induced by Prenatal Stress in Cortical and Hippocampal Morphology and Behaviour in Rats: An Update." *Stress (Amsterdam, Netherlands)* 14 (6): 604–13.
- Weissman M. M., Markowitz J. S., Ouellette R., Greenwald S. and Kahn J. P. 1990. "Panic Disorder and Cardiovascular/cerebrovascular Problems: Results from a Community Survey." *The American Journal of Psychiatry* 147 (11): 1504–8.
- Weitzenblum E., Chaouat A., Kessler R., Oswald M., Apprill M. and Krieger J. 1999. "Daytime Hypoventilation in Obstructive Sleep Apnoea Syndrome." *Sleep Medicine Reviews* 3 (1): 79–93.
- Wetzler S., Jean-Joseph G., Even P., Tomé D., and Larue-Achagiotis C. 2005. "Acute Third Ventricular Administration of Leptin Decreases Protein and Fat in Self-Selecting Rats." *Behavioural Brain Research* 159 (1): 119–25.
- Whimbey A. E. and Denenberg V. H. 1967. "Two Independent Behavioral Dimensions in Open-Field Performance." *Journal of Comparative and Physiological Psychology* 63 (3): 500–504.
- Will C. C., Aird F. and Redei E. E. 2003. "Selectively Bred Wistar-Kyoto Rats: An Animal Model of Depression and Hyper-Responsiveness to Antidepressants." *Molecular Psychiatry* 8 (11): 925–32.
- Willner P. 1984. "The Validity of Animal Models of Depression." *Psychopharmacology* 83 (1): 1–16.
- Willner P., Towell A., Sampson D., Sophokleous S. and Muscat R. 1987. "Reduction of Sucrose Preference by Chronic Unpredictable Mild Stress, and Its Restoration by a Tricyclic Antidepressant." *Psychopharmacology* 93 (3): 358–64.
- Willner P. 1991. "Animal Models as Simulations of Depression." *Trends in Pharmacological Sciences* 12 (4): 131–36.
- Willner P., Muscat R. and Papp M. 1992. "Chronic Mild Stress-Induced Anhedonia: A Realistic Animal Model of Depression." *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 16 (4): 525–34.
- Willner P. 1995. "Animal Models of Depression: Validity and Applications." *Advances in Biochemical Psychopharmacology* 49: 19–41.
- Willner P., Moreau J. L., Nielsen C. K., Papp M. and Sluzewska A. 1996. "Decreased Hedonic Responsiveness Following Chronic Mild Stress Is Not Secondary to Loss of Body Weight." *Physiology & Behavior* 60 (1): 129–34.
- Willner P. and Mitchell P. J. 2002. "The Validity of Animal Models of Predisposition to Depression." *Behavioural Pharmacology* 13 (3): 169–88.
- Wolf W. A., Kuhn D. M. and Lovenberg W. 1981. "Blood Pressure Responses to Local Application of Serotonergic Agents in the Nucleus Tractus Solitarii." *European Journal of Pharmacology* 69 (3): 291–99.
- Womack M. D. and Barrett-Jolley R. 2007. "Activation of Paraventricular Nucleus Neurones by the Dorsomedial Hypothalamus via a Tachykinin Pathway in Rats." *Experimental*

*Physiology* 92 (4): 671–76.

Wong L.-F., Polson J. W., Murphy D., Paton J. F. R. and Kasparov S. 2002. “Genetic and Pharmacological Dissection of Pathways Involved in the Angiotensin II-Mediated Depression of Baroreflex Function.” *The FASEB Journal* 16 (12): 1595–1601.

Wong A. H. C., Gottesman I. I. and A. Petronis. 2005. “Phenotypic Differences in Genetically Identical Organisms: The Epigenetic Perspective.” *Human Molecular Genetics* 14 Spec No 1 (April): R11–18.

Wu H. H. and Wang S. 2010. “Strain Differences in the Chronic Mild Stress Animal Model of Depression.” *Behavioural Brain Research* 213 (1): 94–102.

Wu K. L. H., Chan S. H. H. and Chan J. Y. H. 2012. “Neuroinflammation and Oxidative Stress in Rostral Ventrolateral Medulla Contribute to Neurogenic Hypertension Induced by Systemic Inflammation.” *Journal of Neuroinflammation* 9: 212.

Xiao F., Jiang M., Du D., Xia C., Wang J., Cao Y., Shen L. and Zhu D. 2013. “Orexin A Regulates Cardiovascular Responses in Stress-Induced Hypertensive Rats.” *Neuropharmacology* 67 (April): 16–24.

Xu L., Sun Y., Gao L., Cai Y.-Y. and Shi S.-X.. 2014. “Prenatal Restraint Stress Is Associated with Demethylation of Corticotrophin Releasing Hormone (CRH) Promoter and Enhances CRH Transcriptional Responses to Stress in Adolescent Rats.” *Neurochemical Research* 39 (7): 1193–98.

Yalcin I., Aksu F. and Belzung C. 2005. “Effects of Desipramine and Tramadol in a Chronic Mild Stress Model in Mice Are Altered by Yohimbine but Not by Pindolol.” *European Journal of Pharmacology* 514 (2-3): 165–74.

Yalcin I., Belzung C. and Surget A. 2008. “Mouse Strain Differences in the Unpredictable Chronic Mild Stress: A Four-Antidepressant Survey.” *Behavioural Brain Research* 193 (1): 140–43.

Yang Z. and Coote J. H. 1998. “Influence of the Hypothalamic Paraventricular Nucleus on Cardiovascular Neurones in the Rostral Ventrolateral Medulla of the Rat.” *The Journal of Physiology* 513 ( Pt 2) (December): 521–30.

Yeragani V. K., Radhakrishna R. K. A., Tancer M. and Uhde T. 2002. “Nonlinear Measures of Respiration: Respiratory Irregularity and Increased Chaos of Respiration in Patients with Panic Disorder.” *Neuropsychobiology* 46 (3): 111–20.

Yeragani V. K., Pohl R., Berger R., Balon R., Ramesh C., Glitz D., Srinivasan K. and Weinberg P. 1993. “Decreased Heart Rate Variability in Panic Disorder Patients: A Study of Power-Spectral Analysis of Heart Rate.” *Psychiatry Research* 46 (1): 89–103.

Yeragani V. K., Pohl R., Jampala V. C., Balon R., Ramesh C. and Srinivasan K. 2000. “Increased QT Variability in Patients with Panic Disorder and Depression.” *Psychiatry Research* 93 (3): 225–35.

Yi G., Goldman J. H., Keeling P. J., Reardon M., McKenna W. J. and Malik M. 1997. “Heart Rate Variability in Idiopathic Dilated Cardiomyopathy: Relation to Disease Severity and Prognosis.” *Heart (British Cardiac Society)* 77 (2): 108–14.

- Youdim M. B. H., Edmondson D. and Tipton K. F. 2006. "The Therapeutic Potential of Monoamine Oxidase Inhibitors." *Nature Reviews. Neuroscience* 7 (4): 295–309.
- Young E. A., Lopez J. F., Murphy-Weinberg V., Watson S. J. and Akil H. 1998. "The Role of Mineralocorticoid Receptors in Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis Regulation in Humans." *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 83 (9): 3339–45.
- Young J. K., Wu M., Manaye K. F., Kc P., Allard J. S., Mack S. O. and Haxhiu M. A. 2005. "Orexin Stimulates Breathing via Medullary and Spinal Pathways." *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)* 98 (4): 1387–95.
- Zakzanis K. K., Leach L. and Kaplan E. 1998. "On the Nature and Pattern of Neurocognitive Function in Major Depressive Disorder." *Neuropsychiatry, Neuropsychology, and Behavioral Neurology* 11 (3): 111–19.
- Zangen A., Overstreet D. H. and Yadid G. 1997. "High Serotonin and 5-Hydroxyindoleacetic Acid Levels in Limbic Brain Regions in a Rat Model of Depression: Normalization by Chronic Antidepressant Treatment." *Journal of Neurochemistry* 69 (6): 2477–83.
- Zangen A., Overstreet D. H., Yadid G. 1999. "Increased Catecholamine Levels in Specific Brain Regions of a Rat Model of Depression: Normalization by Chronic Antidepressant Treatment." *Brain Research* 824 (2): 243–50.
- Zerjav S., Tse G. and Scott M. J. W. 2009. "Review of Duloxetine and Venlafaxine in Depression." *Canadian Pharmacists Journal / Revue Des Pharmaciens Du Canada* 142 (3): 144–52.e6.
- Zhang W., Sakurai T., Fukuda Y. and Kuwaki T. 2006. "Orexin Neuron-Mediated Skeletal Muscle Vasodilation and Shift of Baroreflex during Defense Response in Mice." *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 290 (6): R1654–63.
- Zhang E., Yi M.-H., Shin N., Baek H., Kim S., Kim E., Kwon K., et al. 2015. "Endoplasmic Reticulum Stress Impairment in the Spinal Dorsal Horn of a Neuropathic Pain Model." *Scientific Reports* 5: 11555.
- Zhang Y., Li X., Zhang L., Lin Y.-S., Xiao Z.-H., Su Z., Liu Y. and Yang D.-F. 2015. "[Effects of acute cold exposure on pulmonary proinflammatory cytokine of rat]." *Zhongguo Ying Yong Sheng Li Xue Za Zhi = Zhongguo Yingyong Shenglixue Zazhi = Chinese Journal of Applied Physiology* 31 (1): 6–9.
- Zhao Q., Gu D., Lu F., Mu J., Wang X., Ji X., Hu D., et al. 2015. "Blood Pressure Reactivity to the Cold Pressor Test Predicts Hypertension Among Chinese Adults: The GenSalt Study." *American Journal of Hypertension*, March.
- Zhao Y., Zhang Y. and Pan F. 2015. "The Effects of EGb761 on Lipopolysaccharide-Induced Depressive-like Behaviour in C57BL/6J Mice." *Central-European Journal of Immunology / Polish Society for Immunology and Eleven Other Central-European Immunological Societies* 40 (1): 11–17.
- Zimmerman M. C. and Davisson R. L. 2004. "Redox Signaling in Central Neural Regulation of Cardiovascular Function." *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, Neurohumoral control of cardiovascular function from genes to physiology, 84 (2–3): 125–49.



## Résumé de la thèse

Les pathologies associées aux troubles anxieux et dépressifs sont nombreuses et cela constitue donc un réel problème à l'échelle mondiale. Le sujet de mes travaux a porté sur les pathologies cardiorespiratoires associées à ces troubles liés au stress, afin de mieux comprendre les mécanismes centraux impliqués.

Ma thèse a porté sur des études expérimentales élaborées chez le rat et la souris afin d'évaluer l'impact à long terme d'un stress chronique au niveau cardiovasculaire et respiratoire. Le modèle de stress émotionnel répété (défaite sociale) induit un état d'anxiété que l'on peut observer 5 jours après le dernier jour de stress (D10) et qui a disparu au bout de 25 jours après la défaite sociale (D30). Nous avons observé les paramètres cardiorespiratoires de façon ponctuelle lors de ces deux stades sous anesthésie, ainsi que quotidiennement par enregistrement télémétrique. Au niveau cardiovasculaire, à D10 et D30, nous avons observé une tachycardie et une hypertension reflétant une hyperactivation du système nerveux sympathique chez environ la moitié des rats soumis au stress (population D<sub>A</sub>). Le baroréflexe cardio-vagal était également altéré et ces rats présentaient un nombre d'arythmies important et une hypertrophie cardiaque. Au niveau respiratoire, une diminution de la fréquence respiratoire basale ou bradypnée a été notée chez tous les rats à D10 mais qui a persisté uniquement chez une partie des stressés à D30 (population D<sub>L</sub>), dont une grande partie d'entre eux présentaient aussi les altérations cardiovasculaires (83% des D<sub>A</sub> font partie des D<sub>L</sub>). Ainsi, l'état anxieux induit par le stress chronique, même s'il disparaît avec le temps (D30), laisse des traces à long terme au niveau cardiorespiratoire. La population D<sub>A</sub> présente également un taux de BDNF circulant bas, marqueur d'une vulnérabilité à la dépression. En parallèle, une étude réalisée chez la souris et utilisant un protocole de défaite sociale pour induire un phénotype de type dépressif, a révélé des changements cardiovasculaires et respiratoires semblables. Ces données renforcent donc la littérature antérieure montrant un lien néfaste entre les troubles de l'humeur et les pathologies cardiorespiratoires. En effet, ces perturbations, lorsqu'elles sont persistantes, représentent un risque accru de survenue de pathologies cardiaques (arythmies, arrêt cardiaque...) et peuvent être la cause au niveau respiratoire d'une inadaptation ventilatoire aux changements environnementaux.

Nous avons ensuite voulu déterminer le circuit impliqué dans ces altérations. Deux principales zones cérébrales à l'origine de la persistance des modifications cardiorespiratoires ont été identifiées au niveau hypothalamique et bulbaire. En effet, un stress répété induit ainsi une activation du noyau dorsomédian de l'hypothalamus (DMH) et des récepteurs 5HT<sub>3</sub> du noyau du tractus solitaire (NTS), qui se maintient à distance du stress. Une surexpression du BDNF dans la RVL et le NTS a été observée, indiquant probablement l'existence d'un stress oxydant dans ces régions. Quelques résultats préliminaires semblent indiquer que l'origine en serait l'activation des récepteurs AT<sub>1</sub> par l'angiotensine II.

Ces résultats permettent de mettre en lumière l'existence d'une comorbidité entre pathologies anxiodépressives et pathologies cardiorespiratoires, et d'envisager de nouvelles cibles thérapeutiques en vue de réduire cette comorbidité.